

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 3 月 20 日 (20.03.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/023024 A1

(51) 国際特許分類: C12N 5/10, 9/10,
9/26, 15/09, 15/54, 15/63, A01H 5/00, C12Q 1/68, C12P
19/04, 19/16, C08B 30/00

(SATO, Hikaru) [JP/JP]; 〒811-3114 福岡県 古賀市
舞の里 1 丁目 1 8-2 1 Fukuoka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/09221

(74) 代理人: 佐伯 憲生 (SAEKI, Norio); 〒103-0027 東京都
中央区 日本橋三丁目 1 5 番 2 号 高愛ビル 9 階 Tokyo
(JP).

(22) 国際出願日: 2002 年 9 月 10 日 (10.09.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-273166 2001 年 9 月 10 日 (10.09.2001) JP
特願2001-277109 2001 年 9 月 12 日 (12.09.2001) JP
特願2001-277120 2001 年 9 月 12 日 (12.09.2001) JP
特願2001-287010 2001 年 9 月 20 日 (20.09.2001) JP

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特
許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY
CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市
本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中村 保典
(NAKAMURA, Yasunori) [JP/JP]; 〒011-0927 秋田県
秋田市 港北新町 1 0-1-2 0 5 Akita (JP). 藤田 直
子 (FUJITA, Naoko) [JP/JP]; 〒011-0914 秋田県 秋田
市 飯島美砂町 6-6 6-1-4 0 2 Akita (JP). 佐藤 光

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: STARCH SYNTHASES

(54) 発明の名称: デンプン合成酵素類

(57) Abstract: A process for producing novel starch having different starch properties using an enzyme system obtained by genetically modifying an enzyme system synthesizing plant starch; a method wherein a gene encoding a branching enzyme of a starch-producing organism is transferred into a variant lacking this enzyme so as to overexpress the enzyme compared with the original wild type; a method of constructing a variant showing a different expression dose of the enzyme from the original wild type; the thus obtained variant showing a different expression dose of the branching enzyme from the original wild type; and a method of producing starch while controlling the expression of isoamylase during the starch production as in rice, which comprises transferring a gene having rice isoamylase promoter and a promoter located in the upstream of isomaylase gene into a plant.

[続葉有]

Applicants: Zhongyi Li, et al.
U.S. Serial No. NOT YET KNOWN
Filed: Herewith (as §371 national stage
of PCT/AU2004/001517)
Exhibit 3

WO 03/023024 A1



(57) 要約:

本発明は、植物デンプンを合成する酵素系を遺伝子工学的に改造した酵素系によりデンプン特性の異なる新規なデンプンを製造する方法に関する。また、本発明は、デンプンを生産する生物のデンプンの枝作り酵素の1種が欠損した変異体に、当該酵素をコードする遺伝子を導入し元の野生型よりも該酵素を過剰に発現させる方法及び当該酵素の発現量が元の野生型とは異なる変異体を製造する方法、そしてそれによって得られるデンプンの枝作り酵素の1種の発現量が元の野生型とは異なる変異体に関する。さらに、本発明は、イネのイソアミラーゼのプロモーター及びイソアミラーゼ遺伝子上流にプロモーターを配置してなる遺伝子を植物に導入して、デンプンの製造の際のイソアミラーゼの発現がイネと同様に制御されたデンプンを製造する方法に関する。

明 細 書

デンプン合成酵素類

技術分野

本発明は、植物デンプンを改変する方法、植物デンプンを合成する酵素系を遺伝子工学的に改造した酵素系によりデンプン特性の異なる新規なデンプンを製造する方法に関する。

本発明は、植物のデンプンを合成する酵素群である、デンプン合成酵素（Starch synthase（S S））、デンプン枝作り酵素（Starch branching enzyme（S B E））、及びデンプン枝切り酵素（Starch debranching enzyme（D B E））の遺伝子工学的な改変によるデンプン特性の異なる新規なデンプンを製造する方法、そのための酵素類、及びそれをコードする遺伝子に関する。

詳細には、本発明は、デンプン合成酵素（Starch synthase（S S））のサブタイプのひとつであるスターチシンターゼII aをコードする遺伝子に関する。本発明者らは、イネの種類に応じたデンプンの構造や物性の相違がイネのデンプン合成構成酵素のひとつであるスターチシンターゼII aに起因していることを解明し、イネのスターチシンターゼII aをコードする遺伝子を単離し、その構造を解明したことによるものである。より詳細には、本発明は、ジャポニカの例として日本晴（品種名）を、そしてインディカの例としてカサラス（品種名）を用いて、その各々のスターチシンターゼII aをコードする遺伝子を単離し、その構造を比較することにより、その構造上の相違とデンプンの構造や物性の相違との相関関係を明らかにし、この関連性を利用してイネが産生するデンプンの構造や物性を改変させる方法、そのための遺伝子が改変されたイネ、またイネのスターチシンターゼII aに特異的な塩基配列を有する遺伝子断片を用いてイネの種類を検出又は同定する方法を提供するものである。

また、本発明は、デンプン枝作り酵素（Starch branching enzyme（S B E））に関する。生体においては、通常は代謝反応ネットワークにおけるある酵素の効果は、一定量以上になるとほとんどあるいは全く変化しないのが通例であ

る。本発明者らは、生体において特定の酵素が過剰に発現する系を見出した。即ち、本発明は、デンプンを生産する生物のデンプンの枝作り酵素（SBE）の1種を過剰に発現させる方法、当該酵素の発現量がもとの野生型とは異なる変異体、及びその製造方法に関する。本発明は、元の野生型の生物が生産するデンプンとは異なる形質を有するデンプンを製造する方法、その方法で製造された形質の異なるデンプン、及び当該酵素の発現量が元の野生型とは異なる変異体Bを選別し、当該変異体Bを用いて元の野生型が生産するデンプンの形質を改質する方法に関する。

さらに、本発明はデンプン枝切り酵素（Starch debranching enzyme（DBE））のプロモーターに関する。本発明は、デンプンのアミロペクチンの生合成の重要な役割を果たしているイソアミラーゼの遺伝子を発現させるための新規なプロモーターを提供するものである。より詳細には、本発明は、イソアミラーゼ発現用のイネ由来の新規なプロモーターに関する。また、本発明は、これらのプロモーターを含有するベクター、形質転換体、及びイソアミラーゼの発現方法に関する。

背景技術

米は穀物植物として全世界で広く栽培され、世界の人口の約1／3は米食によっている。米は栽培される地域により物理化学的な特性が異なっていることはよく知られている。そして、米の味覚は米のデンプンの質に大きく依存しており、各地域によりその地域に応じた米の種類が選択されてきた。

米の栽培品種としては、オリザサティバ（*Oryza sativa*）とグラベリマステウド（*glaberrima* Steud）の2種類がある。前者はアジアで栽培され熱帯、亜熱帯及び温帯地域に広く分布しているが、後者は西アフリカ地域に極限されている。

雑種の花粉の不捻における遺伝学的分析に基づいて、加藤らはオリザサティバ（*Oryza sativa*）をジャポニカ（*japonica*）とインディカ（*indica*）に分類した（S. Kato, et al., Rep. Bul. Fak. Terkult, Kyushu Irapar. Univ. 1928, 3, 132-147.）。また、森永（T. Morinaga., In Studies on Rice Breeding (A separate volume of Japan. J. Breed.) 1954, 4, 1-14.）及びチャング（T. T.

Chang., Euphytica 1976, 25, 425-441.) は、インディカ (indica)、ジャポニカ (japonica) 及びジャバニカ (javanica) の3種に分類することを提唱した。

このようにオリザサティバ (*Oryza sativa*) (以下、イネという。) の分類については種々の意見が提案され、遺伝学的な分析やイネの種子に含まれているデンプンや脂質の違いなどに基づくイネの分類が報告されてきている。本明細書においては、エステラーゼのアイソザイムの分析、並びに生理学的及び生化学的特性からイネをインディカ (Indica) 及び中国インディカ (Chinese Indica)、並びに、温帯ジャポニカ (Temperate Japonica) 及び熱帯ジャポニカ (Tropical Japonica) の4種に分類することにする。

イネの味覚は主としてそのデンプンによるものであり、ジャポニカのねっとりとした味覚や、インディカのパサパサとした味覚は、それらのデンプンの質の相違によるものであることがわかってきている。また、デンプンは穀物の主成分として食品や飼料として使用されるだけでなく、デキストリン、オリゴ糖、異性化糖などに加工されて加工食品などにも利用され、また、糊や添加剤などとして工業製品やその原材料としても利用されている。

そもそもデンプンは植物のエネルギー貯蔵物質であり、 α -ポリグルコースからなる多糖類の1種で、アミロースとアミロペクチンからなっている。グリコーゲンもデンプンと同様に α -ポリグルコースからなる多糖類であるが、これは主として動物のエネルギー貯蔵物質として利用されている。

デンプンと言っても、稲のデンプン、じゃがいものデンプン、小麦のデンプン、とうもろこしのデンプンなど、植物の種類や品種によりデンプンの形、味、糊化したときの物性などが微妙に異なり、我々はその用途に応じて各種の植物由来のデンプンを使い分けてきている。このようなデンプンの性質の違いはデンプンの微細な化学構造による違いから来ていると説明されてきている。

デンプンは主としてアミロース (Amylose) とアミロペクチン (Amylopectin) からできているものであり、これらによって植物のデンプン粒が形成されているが、デンプン粒の形成にはアミロースは必須ではないとされている。

アミロースは、貯蔵デンプン中の20～30%を占め、グルコース・ユニットが α -1, 4グルコシド結合で繋がっており、少量の α -1, 6グルコシド結合の枝を

含む線状のらせん状の分子である。一方、アミロペクチンはデンプン粒中の70 - 80%を占め、グルコース・ユニットが α -1, 4グルコシド結合で伸び、主鎖と平行に α -1, 6グルコシド結合で枝が繋がった構造をとっている。アミロペクチンのこの特徴的な構造は”クラスター”構造と呼ばれている。

また、動物やバクテリアの貯蔵エネルギーであるグリコーゲン(Glycogen)もデンプンと同じくグルコース・ホモポリマーで構成されているが、アミロペクチンのようなクラスター構造は持っておらず、グリコーゲンは”tree like”や”bush like”構造と呼ばれる不規則な枝分かれ構造であると報告されている。

第1図にアミロース、アミロペクチン、及びグリコーゲンの構造を示す。第1図に示される線は α -グルコースの連鎖であり、アミロース(第1図の(C))は枝分かれがほとんど無く α -1, 4-グルコースのほぼ1本鎖の構造をしている。アミロペクチン(第1図の(B))は規則正しい枝分かれ構造を有し、 α -1, 4-グルコースの連鎖と α -1, 6-グルコースの枝分かれ構造(クラスター)を一定の間隔で規則正しく有している。また、動物などのエネルギー貯蔵物質であるグリコーゲン(第1図の(A))は、全く不規則な枝分かれ構造からなるものである。グリコーゲンはアミロペクチンに比べて分子も小さく、枝も短く、その多くは水溶性の物質である。これに対してアミロペクチンは、枝も長く、かつグルコースが高密度で充填されており、一般に水不溶性の物質である。

このようなアミロペクチンのクラスター構造は、結晶構造を造る際に有利であり、結晶構造によるデンプン粒が形成される。アミロペクチンのクラスター構造は、ほぼ9 nmの規則正しい繰り返し構造であり、この9 nmのサイズは組織や種が異なっても余りばらつきが見られない。

アミロペクチンの構造をさらに詳細に見てゆくと、3タイプの α -1, 4-グルコシド鎖を持っている(第2図参照)。A鎖は最も外側の鎖で鎖の中に分岐結合を持たない鎖である。B鎖は一つの鎖あたり1つ以上の鎖が分岐結合している鎖であり、B鎖はさらに、1つのクラスターにとどまるB1鎖、2つのクラスターに及んでいるB2鎖、3つのクラスターに及ぶB3鎖などがある。C鎖は還元末端を持っている鎖であり、アミロペクチン1分子あたり1つのC鎖を持っている。

このように、アミロペクチンの構造はほぼ一定ではあるが、植物の種類や品種によりアミロペクチンの構造も微妙に異なっている。最近の研究によれば、ねっとりとしたデンプンを有するジャボニカと、パサパサとしたデンプンを有するインディカのアミロペクチンの構造上の相違が報告されている。第3図の上段（第3図の（a））はジャボニカ米のアミロペクチン、第3図の下段（第3図の（b））はインディカ米のアミロペクチンの構造を模式的に示したものである。クラスターの枝の長さを比べるとインディカ米の方が比較的長く、その密度も比較的密になっている。このためにインディカ米のデンプンの方が糊化が難しくなっていると考えられている。

このようなアミロペクチンの微細な構造上の相違は、アミロペクチンを合成する際の合成方法の相違により生起してくると考えられている。アミロペクチンは次の4つのクラスの酵素の連続反応で合成され则认为られている。

- （1）ADPグルコースピロホスホリラーゼ（ADPglucose pyrophosphorylase（AGPase））、
- （2）デンプン合成酵素（Starch synthase（SS））、
- （3）デンプン枝作り酵素（Starch branching enzyme（SBE））、
- （4）デンプン枝切り酵素（Starch debranching enzyme（DBE））

である。

AGPaseは、デンプン・ポリマーの原材料であるADPグルコースを合成する酵素である。デンプン合成酵素（以下、SSと略す。）は、アミロペクチンの非還元末端にADPグルコースを α -1, 4グルコシド結合で繋ぎ、鎖を伸ばす役割をする。SSがアミロペクチンの鎖を伸ばすのに対し、デンプン枝作り酵素（以下、SBEと略す）は、アミロペクチンの α -1, 6グルコシド結合を形成する酵素であり、枝分かれ構造の枝分かれ部分を形成させる酵素である。

第4図にアミロース、アミロペクチン、及びグリコーゲンの合成過程をまとめた。第4図の左側のグリコーゲンの合成は主として動物や細菌類の場合であり、UGPaseはグリコーゲンの材料となるリン酸化グルコースの合成酵素であり、GSはグリコーゲン合成酵素であり、GBEはグリコーゲン枝作り酵素である。第4図の中側は、高等植物の場合のアミロペクチンの合成過程を示すものであり、

図中のSSSは水溶性SSのことである。第4図の右側は高等植物におけるアミロースの合成過程を示すものであり、GBSSは粒結合デンプン合成酵素I (granule-bound starch synthase I (GBSSI)) のことである。

このように、高等植物においては、前記した4種類の酵素群により植物の種類に応じたアミロペクチンを産生している。そして、植物の種類によるアミロペクチンの構造の相違は、これらの酵素の種類の違いによるところが大きいと考えられる。

デンプン合成酵素(SS)には、第4図に示されるように3種類のサブタイプが知られており、それぞれスターチシンターゼI (SSIと略す。)、スターチシンターゼII (SIIと略す。)、及びスターチシンターゼIII (SIIIと略す。)と呼ばれている。SIIaはスターチシンターゼII (SII) のさらにサブタイプである。

一般にイネの胚乳における各スターチシンターゼのサブタイプの含有率は、全スターチシンターゼの約70%がSSIであり、約25%がSIIIであり、残りの約5%がそれ以外のSS (SIIaを含む) であるとされており、アミロペクチンの α -1, 4-グルコシド鎖は主としてSSI及びSIIIにより形成されるものであると考えられていた。

SSはアミロペクチンの鎖を伸ばす酵素であり、アミロペクチンにおける α -1, 4-グルコシド鎖の α -1, 4-グルコースの数(以下、DPと略す。)と深く関わっていると考えられている。本発明者らは、ジャポニカの日本晴(品種名)及び金南風(品種名)と、インディカのカサラス(品種名)及びIR36

(品種名)との胚乳のアミロペクチンの構造を比較し、後者では α -1, 4-グルコシド鎖における α -1, 4-グルコースの数(DP)が11以下のものが著しく少なく、かつDPが12以上で24以下のものに富むことを報告(T. Umemoto, Y. Nakamura, H. Satoh, K. Terashima., Starch, 1999, 51, 58-62.; Y. Nakamura, A. Sakurai, Y. Inaba, K. Kimura, N. Iwasawa, T. Nagamine., Starch 2002, 54, 117-131; T. Umemoto, M. Yano, A. Shomura, Y. Nakamura., Theor. Appl. Genet. 2002, 104, 1-8)してきており、 α -1, 4-グルコースの数(DP)がSSの活性と関係していると考えられているが、その詳細は不明で

あった。

また、デンプン枝作り酵素(SBE)は、デンプンやグリコーゲンの $\alpha-1, 6$ グリコシル結合を作成する唯一の酵素で、本酵素の働きによってグルコース分子を無数に結合した巨大分子、即ちデンプンの主成分であるアミロペクチンやグリコーゲンが形成される。一方、植物細胞で合成されるアミロペクチンと動物やバクテリアで生産されるグリコーゲンでは、高分子内における分岐様式が大きく異なっている。グリコーゲンでは、前者では $\alpha-1, 6$ 分岐結合が分子全体にランダムに形成されるのに対し、アミロペクチンでは、分岐構造が規則性を持って形成されるために、単位構造(クラスターと呼ばれる)が多数タンデム状に連結した構造を示す。この構造の違いが、両者の物性の大きな違いを生む原因となっている。植物のアミロペクチン特有の分岐構造には、SBEの働きが関与している。

植物のSBEには大きく、BEI型とBEII型の2つのサブタイプが存在するが、両タイプの機能の違いはまだ十分には解明されていない。

さらに、従来、SSとSBEがアミロペクチンの枝の頻度を決め、クラスター構造を形成するのに重要な役割を果たしているのではないかと考えられてきた。即ち、前記したデンプン枝切り酵素(DBE)はクラスターの形成に必要な酵素であると考えられていた。しかし、この分解酵素が欠損した植物ではアミロペクチンのクラスターを形成することができないことが明らかにされ、DBEがクラスター構造の形成に不可欠であることを示すことが報告されている(M.G. James, et al., Plant Physiol., (1995) 7, 417-429; Y.Nakamura, et al., Plant J., (1997) 12(1), 143-153; A.Kubo, et al., Plant Phys., (1999) 121, 399-409)。

DBEについてのこれらの報告から、アミロペクチンにおけるクラスター構造の形成は、SSとSBEによる新たな結合の形成だけでなく、SBEにより余分に形成された枝分かれを、DBEにより分解してクラスター構造が規則正しく維持されることが分かってきた。

$\alpha-1, 6$ グルコシド結合の枝を分解するDBEは、基質の違いから2種類のものが知られている。そのひとつはイソアミラーゼ(Isoamylase)であり、他のひとつがプルラナーゼ(Pullulanase(また、R-enzymeやlimit dextrinaseと呼ば

れることもある)) である。これらの2種類のDBEのうちイソアミラーゼは、グリコーゲンやフィトグリコーゲン (phytglycogen) の α -1, 6グルコシド結合の枝を分解することが出来るが、プルラン (pullulan) には作用しない。一方、プルラーゼはプルランには作用するが、グリコーゲンやフィトグリコーゲンには作用しない。

デンプンのクラスター構造を形成させるのに重要な存在であるイソアミラーゼは植物の種類により微妙に異なっているものと推測され、各植物固有のアミロペクチンを形成するものと推測される。また、枝切り酵素のイソアミラーゼが必要なときに必要な量だけ発現させるように、イソアミラーゼの発現の時期や量を制御しているプロモーターも植物に固有のものと考えられ、このような制御により植物固有のアミロペクチンが産生ものと考えられている。

例えば、ジャポニカ米のイソアミラーゼのプロモーターをインディカ米のイソアミラーゼのプロモーターとして導入することにより、イソアミラーゼの発現がジャポニカ米のアミロペクチンの合成時と同じように制御され、枝切り酵素自体はインディカ米のイソアミラーゼであるが、その発現はジャポニカ米のイソアミラーゼの発現と同様に制御され、ジャポニカ米のデンプンとインディカ米のデンプンとのミックスされたデンプンを作る植物体を得ることができるようになるかもしれない。また、イソアミラーゼが同じであるなら、別の植物のプロモーターを導入することによりもとの植物と同様なデンプンをその植物に産生させることができるようになるかもしれない。例えば、耐寒性のあるイネに、おいしいデンプンを作るイネのプロモーターを導入することにより、耐寒性でおいしいデンプンを作るイネを作出することができるかもしれない。

このように、イソアミラーゼのプロモーターは、イソアミラーゼ自体と同様に植物が植物固有のデンプンを作るためのキーとなっているものであり、イソアミラーゼのプロモーターを単離、同定することは、そのメカニズムの解明や植物の改変のみならず、新種のデンプンを創出ということも重要である。

発明の開示

本発明者らは、ジャポニカの日本晴 (品種名) 及び金南風 (品種名) と、イン

ディカのカサラス（品種名）及びIR36（品種名）との胚乳のアミロペクチンの構造を比較し、後者では α -1, 4-グルコシド鎖における α -1, 4-グルコースの数（DP）が11以下のものが著しく少なく、かつDPが12以上で24以下のものに富むことを報告してきた（T. Umemoto, Y. Nakamura, H. Satoh, K. Terashima., Starch, 1999, 51, 58-62.; T. Umemoto, M. Yano, A. Shomura, Y. Nakamura., Theor. Appl. Genet. 2002, 104, 1-8）。

本発明者らは、本明細書に記載しているようにさらに各種のイネについてアミロペクチンの微細構造を比較検討し、その原因となる遺伝子を見出した。即ち、本発明者らは、これらのアミロペクチンの微細構造の相違の原因となっている遺伝子が、スターチシンターゼIIa（以下、SSIIaと略す。）の遺伝子と同じ位置である第6染色体上にちょうど位置していることを見出した。このことはアミロペクチンのDP（ α -1, 4-グルコシド鎖における α -1, 4-グルコースの数）が10以下という短い α -1, 4-グルコシド鎖を伸長して長い鎖を形成することに、SSIIaが極めて重要な役割を果たしていることを示している。

従来、アミロペクチンの α -1, 4-グルコシド鎖は主としてSSI及びSSIIIにより形成されるものであると考えられていたのであるが、ジャポニカとインディカのアミロペクチンの微細な構造上の相違がSSII、特にSSIIaの機能の相違に起因していたとする本発明者らの知見は驚くべきことである。

そして、本発明者らは、インディカ米カサラス（Kasalath）とジャポニカ米日本晴のアミロペクチンの構造の相違を検討し、その構造の相違がスターチシンターゼIIa（SSIIa）によるものであるものであることを解明し、そして、インディカ米Kasalathとジャポニカ米日本晴のSSIIa遺伝子の全塩基配列を決定した。両遺伝子構造の違いがSSIIaの活性の強弱に影響し、その結果アミロペクチンの構造の違いを生じると考えられる。

イネのSSIIaはアミロペクチンの側鎖の伸長に関わっている。この酵素の強弱がアミロペクチンの側鎖の長短に影響し、これによりデンプンの物性や味が劇的に変化する。その原因が今回明らかにされた塩基配列に起因しており、今後、変異部分の改変により、側鎖の長さを自由に改変させ、新規デンプン形質を作成することができることになる。

また、イネのデンプン枝作り酵素（SBE）にはBEI、BEIIa、BEIIbの3つのアイソザイムが存在すると考えられている。本発明者らによるBEIIb遺伝子が欠損したae変異体（amylose-extender(ae)の変異体）の解析から、BEIIbの機能が明らかになりつつある（A.Nishi, Y.Nakamura, N.Tanaka and H.Satoh, (2001) Plant Physiology, 127,459-472）。即ち、本発明者らは、当該ae変異体にBEIIb遺伝子を形質転換し、デンプンの性質が野生型に回復するかを検証することで、BEIIbの特異的な機能を明らかにし、同時に、形質転換イネにおいて、導入したBEIIb遺伝子の発現の強弱によって、さまざまな性質を示す新形質デンプンが出来る事を初めて明らかにした。通常代謝反応ネットワークにおいては、ある酵素の効果は、一定量以上になるとほとんどあるいは全く変化しないのが通例である。それに対して本発明の場合には、BEIIbの活性に応じて、全く性質の異なるデンプンが生産されるようになることを本発明者らは初めて見出した。本発明の過剰発現によるBEIIb遺伝子の制御によって酵素の活性をさまざまなレベルに変動させ、多様なデンプンを生産する方法が初めて明らかにされた。

即ち、本発明者らは、デンプンを生産する生物のデンプンの枝作り酵素の1種が欠損した変異体に、当該酵素をコードする遺伝子を導入することにより、当該酵素の発現量が変化することを見出した。また、当該酵素の発現量に応じて形質の異なるデンプンが生産されることも見出した。より詳細には、イネのBEIIbの遺伝子が欠損したae変異体にBEIIb遺伝子を形質転換することにより、形質転換イネにおいて、導入したBEIIb遺伝子の発現の強弱によって、さまざまな性質を示す新形質のデンプンを生産することができる新規な変異体が生成することを見出した。通常の代謝反応ネットワークにおいては、ある酵素の効果は、一定量以上になるとほとんどあるいは全く変化しないのが通例であるが、それに対して本発明では、導入した遺伝子が野生型とは当該酵素の発現量を異にし、それに応じてBEIIbの活性が異なることから、元の野生型が生産するデンプンとは全く性質の異なるデンプンが生産されるようになることは驚くべきことである。

さらに、本発明者らは、イネ、特にジャボニカ米におけるイソアミラーゼのプロモーターを見出した。

本発明は、植物のデンプン合成酵素系の1種又は2種以上の酵素を遺伝子工学的に改変して、野生型の植物が製造するデンプンとは異なる特性を有する新規なデンプンを製造する方法を提供するものである。即ち、本発明は、植物が生産するデンプンの形質を改質する方法、元の野生型とは形質が異なるデンプンを製造する方法、及び形質が改変されたデンプンを提供するものである。

詳細には、本発明は、第一にデンプン合成酵素IIa (SSIIa)に関するものであり、第二にデンプン枝作り酵素IIb (BEIIb)に関するものであり、第三にデンプン枝切り酵素の1種であるイソアミラーゼのプロモーターに関するものである。

より詳細には、本発明は、インディカ米、ジャポニカ米のアミロペクチンの鎖長分布や、デンプンの物性や味に影響を与えている原因となる遺伝子を解明し、その構造の相違やそれに基づく機能を明らかにすることを目的としている。

また、本発明は、この遺伝子構造の相違を利用し、その機能を制御することによりデンプンの物性や味が改変されたデンプンを製造する方法を提供することを目的としている。

さらに、本発明は、イネ、特にジャポニカ米におけるイソアミラーゼのプロモーターを提供するものである。また、本発明は前記したイソアミラーゼのプロモーターが導入された植物、及び当該植物が産生する新規なデンプンの製造方法を提供するものである。

さらに詳細には、本発明は、イネのスターチシンターゼIIaをコードする遺伝子に関する。より詳細には、イネが、ジャポニカ米の日本晴（品種名）又はインディカ米のカサラス（品種名）のであるスターチシンターゼIIaをコードする遺伝子に関する。さらに詳細には、スターチシンターゼIIaをコードする遺伝子が、配列表の配列番号1若しくは2に示される塩基配列、又はストリージェントな条件下でそれとハイブリダイズし得る塩基配列を有するものであるイネのスターチシンターゼIIaをコードする遺伝子に関する。本発明のスターチシンターゼIIaをコードする遺伝子はプロモーター領域を含むものであってもよいし、含まないものであってもよい。

また、本発明は、前記したイネのスターチシンターゼIIaをコードする遺伝子

を発現させるためのプロモーターに関する。

さらに、本発明は、前記したイネのスターチシンターゼII aをコードする遺伝子の塩基配列、又はそれと相同性を有するようにイネのスターチシンターゼII aをコードする遺伝子の塩基配列が改変された遺伝子改変イネデンプンに関する。

また、本発明は、イネのスターチシンターゼII aをコードする遺伝子とそのプロモーター領域の遺伝子の塩基配列の全部又は一部を、他の種類のイネのスターチシンターゼII aをコードする遺伝子とそのプロモーター領域の遺伝子の塩基配列に対応するように改変された遺伝子改変イネを用いて、元のイネとは異なる鎖長分布、物性又は味を有するデンプンを製造する方法に関する。

さらに、本発明は、イネのスターチシンターゼII aをコードする遺伝子の塩基配列になかの、イネのスターチシンターゼII a遺伝子に特異的な塩基配列を含有してなるオリゴヌクレオチド、及びそれを用いたイネの種類を検出又は同定する方法に関する。

また、本発明は、デンプンを生産する生物のデンプンの枝作り酵素の1種が、元の野生型の生物とは異なる量発現する変異体を用いて、元の野生型の生物が生産するデンプンとは異なる形質を有するデンプンを製造する方法に関する。より詳細には、本発明は、イネのデンプンの枝作り酵素の1種である枝作り酵素II b (B E II b) の発現量が元の野生型の生物とは異なる変異体を用いて、元のイネが生産するデンプンとは異なる形質を有するデンプンを製造する方法に関する。

さらに、本発明は、元の野生型の生物が生産するデンプンとは異なる形質を有するデンプンに関する。より詳細には、本発明は、イネのデンプンの枝作り酵素の1種である枝作り酵素II b (B E II b) の発現量が元の野生型の生物とは異なる変異体を用いた、元のイネが生産するデンプンとは異なる形質を有するデンプンに関する。本発明のデンプンの形質は、好ましくはデンプンの糊化の特性により示されるものであり、また、デンプンの単位構造（クラスター）を形成する鎖の長さが、元の野生型の生物が生産するデンプンのそれとは異なることを特徴とするデンプンである。

さらに、本発明は、デンプンを生産する生物のデンプンの枝作り酵素の1種が欠損した変異体Aを製造し、次いでこの変異体Aに当該酵素をコードする遺伝子

を導入して、当該酵素の発現量が元の野生型とは異なる変異体 B を選別し、当該変異体 B を用いて元の野生型が生産するデンプンの形質を改質する方法に関する。より詳細には、イネの枝作り酵素の 1 種である枝作り酵素 IIb (BEIIb) が欠損した変異体 A を製造し、次いでこの変異体 A に当該酵素をコードする遺伝子を導入して、当該酵素の発現量が元の野生型とは異なる変異体 B を選別し、当該変異体 B を用いて元の野生型が生産するデンプンの形質を改質する方法に関する。

また、本発明は、デンプンを生産する生物のデンプンの枝作り酵素の 1 種が欠損した変異体に、当該酵素をコードする遺伝子を導入して、当該酵素を元の野生型よりも過剰に発現させる方法に関する。より詳細には、本発明は、イネのデンプンの枝作り酵素の 1 種である枝作り酵素 IIb (BEIIb) を野生型よりも過剰に発現させる方法に関する。

さらに、本発明は、デンプンを生産する生物のデンプンの枝作り酵素の 1 種が欠損した変異体に、当該酵素をコードする遺伝子を導入して、当該酵素の発現量が元の野生型とは異なる種を選別することからなる、デンプンの枝作り酵素の 1 種の発現量が元の野生型とは異なる変異体を製造する方法に関する。そして、当該酵素の発現量の相違により、元の野生型の生物とは異なる形質を有するデンプンを生産することを特徴とする変異体の製造方法に関する。より詳細には、本発明は、イネのデンプンの枝作り酵素の 1 種である枝作り酵素 IIb (BEIIb) の発現量が元の野生型とは異なる変異体を製造する方法に関する。

さらに、本発明は、デンプンを生産する生物のデンプンの枝作り酵素の 1 種の発現量が元の野生型とは異なる変異体に関する。そして、当該酵素の発現量の相違により、元の野生型の生物とは異なる形質を有するデンプンを生産することを特徴とする変異体に関する。より詳細には、本発明は、イネのデンプンの枝作り酵素の 1 種である枝作り酵素 IIb (BEIIb) の発現量が元の野生型とは異なる変異体に関する。

また、本発明は、イネのイソアミラーゼのプロモーターに関する。好ましくは配列表の配列番号 1 に記載された塩基配列、この一部の塩基は置換、欠失、もしくは他の塩基が付加されてなる塩基配列、又はこれらの塩基配列にストリージェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を有するイネのイソアミラーゼの

プロモーターに関する。

また、本発明は、植物のイソアミラーゼのプロモーターが、前記した本発明のプロモーターで置換された形質転換植物に関する。

さらに、本発明は、イソアミラーゼ遺伝子上流に前記した本発明のプロモーターを配置してなる遺伝子を植物に導入して、デンプンの製造の際のイソアミラーゼの発現がイネと同様に制御されたデンプンを製造する方法に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、生物における貯蔵性ポリグルカンの構造を示す概念図である。

第2図は、アミロペクチンのクラスター構造を示すものである。

第3図は、イネ胚乳におけるジャポニカとインディカとのアミロペクチンのクラスター構造の相違を示すものである。

第4図は、生物における貯蔵性ポリグルカンである、アミロース、アミロペクチン、及びグリコーゲンの生合成経路の概要を示すものである。

第5図は、ジャポニカの#143とインディカの#303についての鎖長分布を分析した結果を示すものである。第5図の上段の図（第5図A）は各々の鎖長の分布を示し、横軸は鎖長（ $\alpha-1$, 4-鎖における $\alpha-1$, 4-グルコースの数）を示し、縦軸は頻度（モル%）を示す。白抜きはジャポニカ（#143）を示し、黒塗りはインディカ（#303）を示す。第5図の下段の図（第5図B）は、各々の鎖長におけるジャポニカ（#143）の頻度からインディカ（#303）の頻度を引いた（#143 - #303）差を頻度（%）として示している。

第6図は、いくつかの種類のイネについてインディカ（#303）との鎖長の分布の差を第5図Bと同様にして分析した結果を示すものである。第6図は左側の上から#103との差、#234との差、#310との差、及び#409との差を示し、右側は#215との差、#202との差、#302との差、及び#408との差をそれぞれ示す。

第7図は、今回調査した129品種について算出されたACRの値におけるヒストグラムを示している。横軸はACRの値を示し、縦軸は出現頻度を示している。

第 8 図は、今回調査した各種類のイネについて第 7 図と同様にヒストグラム化したものである。第 8 図に左上は温帯ジャポニカ (Temperate Japonica) のものであり (個数は 47)、右上は熱帯ジャポニカ (Tropical Japonica) のものであり (個数は 34)、左下はインディカのものであり (個数は 23)、右下は中国のインディカのものである (個数は 25)。

第 9 図は、アミロペクチンの微細構造とデンプンの熱特性の相関を示す相関図である。第 9 図の横軸はデンプンの糊化開始温度 (T_o (°C)) を示している。縦軸はアミロペクチンの DP が 10 以下の量の比 (ACR) を示している。第 9 図の黒菱形印 (◆) は温帯ジャポニカを示し、黒四角印 (■) は熱帯ジャポニカを示し、黒三角印 (▲) はインディカを示し、バツ印 (×) は中国インディカをそれぞれ示している。

第 10 図は、は今回調査した 129 品種のうちの 100 品種についてのアミロース含有量のヒストグラムを示している。横軸はアミロース含有量 (全デンプンに対する割合 (%)) を示し、縦軸は出現頻度を示している。

第 11 図は、今回調査した各種類のイネについて第 10 図と同様にヒストグラム化したものである。第 11 図に左上は温帯ジャポニカ (Temperate Japonica) のものであり (個数は 38)、右上は熱帯ジャポニカ (Tropical Japonica) のものであり (個数は 25)、左下はインディカのものであり (個数は 19)、右下は中国のインディカのものである (個数は 18)。

第 12 図は、デンプンのアミロース含有率と糊化開始温度との相関を示す相関図である。第 12 図の横軸はデンプンの糊化開始温度 (T_o (°C)) を示している。縦軸はデンプンのアミロース含有率 (%) を示している。第 12 図の黒菱形印 (◆) は温帯ジャポニカを示し、黒四角印 (■) は熱帯ジャポニカを示し、黒三角印 (▲) はインディカを示し、バツ印 (×) は中国インディカをそれぞれ示している。

第 13 図は、本発明の日本晴とカサラスのスターチシンターゼ IIa (starch synthase, SSIIa) 遺伝子の構造を示すものである。第 13 図の四角枠はエキソン領域を示し、四角枠の間はイントロンを示す。それぞれの番号は、エキソン及びイントロンの順序を示している。第 13 図中のアスタリスクは、アミノ酸が変

わる部分を示している。第 13 図には併せて制限酵素による切断位置を示す。

第 14 図～第 18 図は、日本晴（5935 bp）とカサラス（5928 bp）のゲノム SSIIa 遺伝子の全配列の比較して示すものである。第 14 図～第 18 図の各図の各行の上段が日本晴のものであり、下段がカサラスのものである。このうちプロモーター部分は日本晴では 1～1, 341 番目までであり、カサラスでは 1～1, 331 番目までである。

第 14 図はこのうちの 1 番目～1260 番目（日本晴）までの比較を示している。

第 15 図はこのうちの 1261 番目～2520 番目（日本晴）までの比較を示している。

第 16 図はこのうちの 2521 番目～3779 番目（日本晴）までの比較を示している。

第 17 図はこのうちの 3780 番目～5037 番目（日本晴）までの比較を示している。

第 18 図はこのうちの 5038 番目～5935 番目（日本晴）までの比較を示している。

第 19 図～第 20 図は、日本晴とカサラスのそれぞれのエキソン部分の塩基配列（2607 bp）の比較を示すものである。第 19 図～第 20 図の各図の各行の上段が日本晴のものであり、下段がカサラスのものであり、転写開始点を 1 番にしている。

第 19 図はこのうちの 1 番目～1260 番目までの比較を示している。

第 20 図はこのうちの 1261 番目～2607 番目までの比較を示している。

第 21 図は、日本晴とカサラスの SSIIa のアミノ酸配列の比較を示すものである。第 21 図の各行の上段が日本晴のものであり、下段がカサラスのものである。

第 22 図は、各品種が製造するデンプン（アミロペクチン）の DP（ $\alpha - 1$, 4-グルコシド鎖における $\alpha - 1$, 4-グルコースの数）を測定した結果を示したものである。第 22 図の上段は品種金南風（Kinmaze）のものであり、中段は品種 IR36 のものであり、下段は形質転換体 #78-1 のものである。中段及び

下段の右側は、各品種の品種金南風（Kinmaze）との差を示している。即ち、中段の右側は各DPにおける品種金南風（Kinmaze）と品種IR36との差を示したものであり、下段の右側は各DPにおける品種金南風（Kinmaze）と形質転換体#78-1との差を示したものである。

第23図は、本発明の形質転換体の中から#106-1、#31-1、#113-7、及び#7-8についてサザンブロット（Southern blot）解析を行った結果を示す、図面に代わる写真である。第23図は左から「金南風」（Kinmaze）、EM10、#106-1、#31-1、#113-7、及び#7-8の各レーンを示し、第23図の上段の（a）はBamHIを用いた場合であり、下段の（b）はHindIIIを用いた場合である。

第24図は、本発明の形質転換体についてノーザンブロット（Northern blot）解析を行った結果を示す、図面に代わる写真である。第24図の左から、「金南風」、EM10、#106-1、#31-1、#113-7、#7-8、ひとつ間を置いて、#1-1、#2-6、及び#9-8の各レーンを示し、縦方向はデンプンを製造する際の各デンプン合成酵素を示す。BEIはデンプン枝分かれ酵素Iを、BEIIaはデンプン枝分かれ酵素IIaを、SSIはデンプン合成酵素Iを、SSIIIはデンプン合成酵素IIIを、ISAはイソアミラーゼを、PULはプルナーゼを、それぞれ示している。最下段はrRNA（リボソームRNA）を示す。

第25図は、本発明の形質転換体の中から#106-1、#31-1、#113-7、#7-8及び#1-1についてウエスタンブロット（Western blot）／活性染色法による解析（第25図上段）、及びネイティブPAGE／BE活性染色法による解析（第25図下段）を行った結果を示す、図面に代わる写真である。第25図の上段の左から「金南風」（Kinmaze）、EM10、#7-8、#9-8、#106-1、#31-1、#113-7、及び#1-1の各レーンを示し、縦方向はBEI及びBEIIbのプロットを示す。第25図の下段の左から「金南風」（Kinmaze）、EM10、ae変異型、相補型（Complement型）、過剰発現型（Over expression型）を示し、縦方向はBEIIa、BEIIb、及びBEIをそれぞれ示す。

第26図は、本発明の形質転換体及びa e変異体のEM10について、アミロペクチンの鎖長の分布を野生型（金南風）の鎖長分布と比較した結果を示すグラフである。第26図の横軸は鎖長の長さを1～60まで示しており、第26図の縦軸は各鎖長における野生型（金南風）との鎖長分布の割合（％）の差を示している。第26図の上段は、EM10（黒丸印－●－）、形質転換体の相補型（Complement型）（#106－5）（白丸印－○－）、並びにa e変異型（#7－8）（黒三角印－▲－）及びa e変異型（#9－8）（黒四角印－■－）についてのものであり、第26図の下段は、形質転換体の過剰発現型（Over expression型）（#31－1）（黒丸印－●－）、形質転換体の過剰発現型（Over expression型）（#113－7）（黒四角印－■－）、及び形質転換体の過剰発現型（Over expression型）（#1－1）（黒三角印－▲－）についてのものである。

第27図は、本発明の新規なデンプンを走査型電子顕微鏡でそれらの形態を観察した結果を示す図面に代わる写真である。第27図の上段は1000倍に拡大した場合を示し、下段は4000倍に拡大した場合を示している。それぞれの写真の白いバーはスケールを示している。第27図の各段の左からEM10、#7－8、#9－8、#106－1、その下段の左から金南風（Kinmaze）、#31－1、#113－7、及び#1－1をそれぞれ示している。

第28図は、本発明の新規なデンプンをX線回折パターンを調べた結果を示す。第28図の縦軸は強度（cps）を示し、横軸は回折角度（ 2θ ）を示す。第28図の上からEM10（A）、#7－8（B）、#9－8（C）、#106－1（D）、金南風（Kinmaze）（E）、#31－1（F）、及び#113－7（G）をそれぞれ示す。

第29図は、イネのイソアミラーゼcDNAの#26クローンの制限酵素地図と、その下段の本発明の方法で用いたプローブA及びプローブBの位置を示すものである。

第30図は、イネ（キタアケ）のBACライブラリーが転写されている4枚のメンブレンシートを用いて、プローブAによりサザンハイブリダイゼーション（ECL法）を行った結果を示す図面に代わる写真である。

No. 2のシートに2つのポジティブクローン（#59及び#60）が得られ

た（図中の矢印）。

第31図は、ポジティブクローン#59及び#60を8種類の制限酵素で切断し、プローブAを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った結果を示す図面に代わる写真である。

左からHindIII、EcoRI、XhoI、SacI、SalI、SpeI、PstI、及びXbaIの8種類の制限酵素を示し、各酵素の左側のレーンはクローン#59を、右側はクローン#60を示す。縦軸は塩基長を示す。

第32図は、ポジティブクローン#59及び#60を8種類の制限酵素で切断し、プローブBを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った結果を示す図面に代わる写真である。

左からHindIII、EcoRI、XhoI、SacI、SalI、SpeI、PstI、及びXbaIの8種類の制限酵素を示し、各酵素の左側のレーンはクローン#59を、右側はクローン#60を示す。縦軸は塩基長を示す。

第33図は、本発明の結果から示されるイネのイソアミラーゼのゲノミックDNAを模式的に示したものであり（第33図のA）、四角で囲った部分はエキソンをしめす。第33図の中段のBは、その制限酵素地図を拡大して示したものである。第33図下段のCは、クローン#60をいくつかの制限酵素で切断して得られた各種のサブクローンの領域を模式的に示したものである。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、第一にデンプン合成酵素IIa（SSIIa）による改変、第二にデンプン枝作り酵素IIb（BEIIb）による改変、及び第三にデンプン枝切り酵素の1種であるイソアミラーゼのプロモーターによるデンプンの改変に関するものである。以下、これらを順に説明する。

1. デンプン合成酵素IIa（SSIIa）による改変

本発明者らは、各種のイネのデンプンの物性や構造を調べた（Y. Nakamura, A. Sakurai, Y. Inaba, K. Kimura, N. Iwasawa, T. Nagamine. Starch 2002, 54, 117-131.）。そして、イネの種類によるデンプンの違いを物性面のみならず、ア

ミロペクチンの構造から分析し、次いでこのようなアミロペクチンの構造の違いが生じる原因となる遺伝子を解明することにした。

まず、本発明者らは世界各地で栽培されている各種のイネの中から、温帯ジャポニカ (Temperate Japonica) 47 品種、熱帯ジャポニカ (Tropical Japonica) 34 品種、インディカ 23 品種、および中国のインディカ 25 品種を収集し、それぞれのデンプンを解析して検討した。その結果を以下の表 1～表 4 に示す。

アミロペクチンの微細構造を分析するために、アミロペクチンをイソアミラーゼで分解し、各アミロペクチンの $\alpha-1, 4$ -鎖の鎖長のモル分布をキャピラリー電気泳動で分析した。この方法は、各々の $\alpha-1, 4$ -鎖における $\alpha-1, 4$ -グルコースの数 (鎖長 (DP)) を 100 個まで、各々の鎖長における全体に対するモル分率として定量的に調べることができるので、種々の品種におけるアミロペクチンの微細構造を検討には好都合のものである。本発明者らは、先にジャポニカは、インディカに比べて、鎖長 (DP) が 25 以上のものについては両者に明確な相違はないが、鎖長が 11 以下のものが多く分布し、鎖長が 12～24 のものは少ないことを報告してきた。アミロペクチンのクラスターの長さは、アミロペクチンのソースとして使用される植物の品種の依存していることはよく知られており、インディカとジャポニカのアミロペクチンの微細構造の相違が前述したような極僅かなものであることは驚くべきことであった。

また、アミロペクチンのクラスター内の鎖長、即ち A 鎖と B₁ 鎖の最大長は 24 であることが報告されており (Hanashiro et al., 1996)、そこで各イネについて、鎖長が 24 までについて、鎖長が 24 までの量に対する鎖長が 10 以下である量の比 (DP が 10 以下の量 / DP が 24 以下の量) を算出した。この比は、アミロペクチンのクラスターに占める短い鎖の割合 (存在比) を表す。

各イネについてのこれらの結果を次の表 1～表 4 に示す。表 1 は 47 品種についての温帯ジャポニカ (Temperate Japonica) のものであり、表 2 は 34 品種についての熱帯ジャポニカ (Tropical Japonica) のものであり、表 3 は 23 品種についてのインディカのものであり、表 4 は 25 品種についての中国のインディカのものである。

表 1

1. 温帯ジャポニカ

No.	品種名	パスポート 番号	アミロ ペクチン $\Sigma DP \leq 10 /$ $\Sigma DP \leq 24$	温度特性		アミロース 含有量(%)	フェノール 色素反応
				糊化開始 温度 (°C)	糊化最大 温度 (°C)		
101	Ahagarashimai	00012163	0.264	nd	nd	19.7	1
102	Atokoku	00005505	0.271	nd	nd	18.0	0
103	Araki	00008085	0.265	58.3	65.8	20.0	0
104	Asahi	00007432	0.263	56.6	64.7	20.9	0
105	Banzai	00007709	0.264	nd	nd	17.9	0
106	Bouzu Mochi	00005467	0.266	nd	nd	1.1	0
107	Chousen Zairai Mochi	00012710	0.250	nd	nd	0.8	0
108	Danema	00012162	0.274	57.7	64.8	31.9	1
109	Fujihikari	00011271	0.240	61.3	68.9	nd	nd
110	Fujisaka 5	00007457	0.253	nd	nd	18.8	0
111	Gaisen Mochi	00004847	0.259	nd	nd	16.1	1
112	Ginbozu	00007572	0.264	58.3	65.6	20.0	0
113	Hajikuroho	00012159	0.274	55.9	63.2	34.6	0
114	Hakamuri	00005043	0.268	57.1	65.0	14.7	1
115	Huanggu	00012750	0.241	61.3	68.2	14.7	0
116	Ishuu Akaho	00007974	0.260	nd	nd	34.4	0
117	Joushuu	00007737	0.269	nd	nd	19.4	0
118	Jukkoku	00010577	0.270	nd	nd	20.0	0
119	Kahel	00005041	0.268	58.5	65.6	12.9	0
120	Kamenoo	00004950	0.267	57.6	66.5	15.9	0
121	Kaneko	00005265	0.262	nd	nd	15.8	1
122	Kinmaze	00016266	0.258	57.0	66.7	nd	nd
123	Kirishima	00005057	0.254	58.5	66.4	14.5	1
124	Kpkuryou Miyako	00008050	0.263	nd	nd	20.4	0
125	Kurohige	00005302	0.252	nd	nd	19.3	0
126	Kurumi Wase	00004902	0.249	59.4	66.7	18.6	1
127	Miyako	00008224	0.262	nd	nd	18.0	0
128	Morita Wase	00008087	0.255	60.9	68.5	17.1	0
129	Nagae Wase	00005158	0.256	58.2	66.9	15.0	0
130	Nago Akaho	00012161	0.277	51.6	60.8	29.7	0
131	Nakate Shinsenbon	00016467	0.265	58.2	65.4	17.4	0
132	Nipponbare	00009850	0.248	59.1	67.2	nd	nd
133	Oknawa Zairai Bun 2	00008310	0.271	nd	nd	28.7	0
134	Omachi	00008319	0.270	nd	nd	18.8	0
135	Ouba	00007084	0.261	nd	nd	4.3	0
136	Pijiru Mai	00012164	0.249	nd	nd	29.1	1
137	Senichi	00008042	0.256	nd	nd	20.4	0
138	Senshou	00004778	0.263	nd	nd	22.7	1
139	Shinrid	00007429	0.265	nd	nd	22.6	0
140	Shinshu Kaneko	00008285	0.250	60.2	67.8	17.9	0
141	Shiro Senbon	00007643	0.286	57.7	66.5	18.6	0
142	Shisumuchi Mai	00012158	0.247	57.7	65.8	15.5	0
143	Tai chung 65	00013424	0.287	59.6	67.2	21.1	0
144	Tosa Mochi	00005252	0.268	nd	nd	0.1	1
145	Ushino Tane	00012160	0.252	nd	nd	34.2	1
146	Wzbeuskj 2	00016470	0.281	nd	nd	nd	nd
147	Zairai Soutou	00012508	0.258	nd	nd	nd	nd

表 2

II. 熱帯ジャポニカ

No.	品種名	パスポート 番号	アミロ ペクチン $\Sigma DP \leq 10$ $\Sigma DP \leq 24$	温度特性		アミロース 含有量(%)	フェノール 色素反応
				糊化開始 温度 (°C)	糊化最大 温度 (°C)		
201	Alborio	00014538	0.251	nd	nd	15.9	0
202	Basilanon	00013516	0.169	68.0	72.9	21.5	0
203	Bodai Mayang	00013832	0.191	nd	nd	25.9	0
204	Canabongbong	00013567	0.186	65.0	71.8	27.5	0
205	Dam Ngo	00013671	0.249	nd	nd	0.8	0
206	Daw Dain	00013735	0.251	nd	nd	0.4	0
207	Deng Mak Tek	00013674	0.252	nd	nd	4.9	0
208	Dinalaga	00042346	0.176	64.6	70.5	27.5	0
209	Dourado Precoco	00016084	0.189	nd	nd	26.3	0
210	Garaldine	00016079	0.185	66.3	73.6	26.0	0
211	Haogang	00050158	0.254	58.3	67.4	4.2	0
212	In Sitt	00013972	0.190	nd	nd	23.2	0
213	Ketan Gading	00083652	0.255	57.8	65.2	3.5	1
214	Khao Nok ¹	00013672	0.254	nd	nd	3.3	0
215	Khauk Yoe	00013977	0.220	61.1	69.9	24.3	0
216	Ladang	00013830	0.195	65.8	71.5	26.2	0
217	Lep Xang	00013875	0.264	53.3	62.9	2.5	0
218	Mack Kheua	00013670	0.248	60.0	67.5	3.7	0
219	Masmikr	00013833	0.186	nd	nd	22.2	0
220	Mengliangu	00048124	0.177	nd	nd	22.2	0
221	Moroberekan	00015851	0.183	nd	nd	24.2	0
222	Nan Jing Xiang Tao	00012979	0.254	56.9	64.5	0.1	0
223	Northrose	00015890	0.241	62.5	69.3	16.4	0
224	Padi Kenikr Putuh	00013834	0.186	64.5	71.6	23.7	0
225	Page Minyak	00013835	0.195	65.2	72.5	21.3	0
226	Ranto Kayo	00081381	0.180	nd	nd	25.0	0
227	Sarupee (Kuroishi)	00012477	0.187	nd	nd	22.5	0
228	Serendah Bulat	00081355	0.196	nd	nd	22.8	0
229	Slampang	00013836	0.194	66.3	73.3	23.9	0
230	Simanoek	00013816	0.191	62.4	69.7	21.0	0
231	Sirmedel	00013839	0.189	62.6	69.8	21.7	0
232	Tambo	00016049	0.177	65.8	72.8	27.8	0
233	Texas Fortuna	00015907	0.191	nd	nd	22.4	0
234	Vista	00015893	0.249	60.3	67.5	15.7	0

表 3

Ⅲ. インディカ

No.	品種名	パスポート 番号	アミロ ペクチン $\Sigma DP \leq 10 /$ $\Sigma DP \leq 24$	温度特性		アミロース 含有量(%)	フェノール 色素反応
				糊化開始 温度 (°C)	糊化最大 温度 (°C)		
301	Bhalamokodo	00014741	0.190	nd	nd	nd	nd
302	Chinsurah Boro 2	00014048	0.165	67.7	72.9	26.7	1
303	Go 13	00014023	0.159	67.1	72.0	32.3	1
304	Col/Nepal/3	00015068	0.173	68.3	73.4	27.1	0
305	Col/Nepal/4	00015069	0.177	nd	nd	29.7	1
306	Dular	00014027	0.171	nd	nd	31.1	0
307	Erolya	00014761	0.246	54.6	64.0	17.9	1
308	Gangala	00015211	0.166	68.9	73.3	28.4	1
309	Godi Khadara	00014145	0.180	nd	nd	nd	nd
310	IR 28	00013558	0.243	57.0	64.7	31.7	1
311	IR 36		0.166	69.5	73.8	nd	nd
312	Jhona 349	00014504	0.174	68.2	73.9	32.0	1
313	Kasalath		0.173	67.8	72.8	nd	nd
314	Khao Lap Don	00080187	0.268	51.1	61.2	18.9	1
315	Leed Rice	00053920	0.181	68.4	71.6	31.0	1
316	Milyang 23	00037123	0.249	60.2	66.3	17.7	1
317	Pachchal Perumal	00013792	0.188	67.6	72.3	32.6	1
318	Panchang	00014447	0.188	nd	nd	33.0	1
319	Pusur	00014028	0.163	67.5	72.0	31.5	1
320	Sabari	00014105	0.252	53.5	60.9	30.0	1
321	Shwe War	00013963	0.187	61.8	69.5	25.9	0
322	Surjamkhi	00014003	0.167	69.2	73.6	34.9	0
323	T246	00013988	0.172	nd	nd	34.5	1

表 4

Ⅳ. 中国のインディカ

No.	品種名	パスポート 番号	アミロ ペクチン $\Sigma DP \leq 10 /$ $\Sigma DP \leq 24$	温度特性		アミロース 含有量(%)	フェノール 色素反応
				糊化開始 温度 (°C)	糊化最大 温度 (°C)		
401	Al Jiao Nan Te	00012980	0.176	nd	nd	31.2	1
402	Changmaoluoping	00054438	0.189	nd	nd	nd	nd
403	Chibaigu	00054418	0.189	nd	nd	33.0	1
404	Daheigu	00054435	0.196	63.4	69.0	31.6	1
405	Dahuanggu	00084009	0.187	63.4	69.9	1.6	0
406	Dahuangpigu	00077414	0.253	53.8	60.5	nd	nd
407	Dao Ren Qiao	00012489	0.175	69.5	73.7	35.9	1
408	Duan Guang Huo Luo	00013262	0.166	68.3	73.1	31.6	1
409	Gui Zhao 2	00042222	0.260	53.1	60.7	33.1	1
410	Hong Jiao Zhan	00013413	0.254	59.7	66.5	1.0	1
411	Hong Mi Hsien	00013073	0.176	nd	nd	33.1	0
412	Hu Nan Xian	00013270	0.174	nd	nd	33.2	1
413	Kao Man Long	00013145	0.263	61.6	68.2	1.3	1
414	Liu Zhou Bao Ya Zhao	00012890	0.166	67.6	72.8	32.0	1
415	Longgu	00054442	0.189	61.9	67.7	31.7	1
416	Mangjiangu	00048129	0.186	68.7	72.5	34.3	1
417	Moxianggu	00048125	0.179	nd	nd	32.3	1
418	Qing You	00013252	0.175	68.6	73.2	31.9	1
419	Wu Gu Hua Luo	00013315	0.166	69.2	74.1	32.9	1
420	Xi Li Gu	00013399	0.172	nd	nd	32.2	1
421	Xiaobainuogu	00078020	0.265	52.6	62.6	0.7	0
422	Xiaohuangnuo	00077419	0.180	nd	nd	nd	nd
423	Xibaigu	00047620	0.168	67.7	73.0	31.3	1
424	Ximeigu	00078019	0.175	64.0	70.5	32.1	0
425	Yu Xi Hong Gu	00086499	0.171	nd	nd	34.2	1

各表の左欄から、整理番号 (No)、品種名、パスポート番号、アミロペクチンの差長が 10 以下の割合、糊化開始温度と糊化最大温度の温度特性、アミロース含有量、及びフェノール色素反応の結果を示している。整理番号は、温帯ジャポニカ (Temperate Japonica) を 100 番台とし、熱帯ジャポニカ (Tropical Japonica) を 200 番台とし、インディカを 300 番台とし、そして中国のインディカを 400 番台として、各種類において連続番号がふされている。パスポート番号は、筑波の独立行政法人農業生物資源研究所で使用されている番号であり、アミロペクチンの鎖長が 10 以下の割合は、前記してきた鎖長が 24 以下の全量に対する鎖長が 10 以下の量の割合 (モル) を示し、アミロース含有量は胚乳の全デンプンに対するアミロースのわりあい (重量%) を示し、フェノール色素反応はフェノール溶液において反応が有ったものを「1」と表記し、反応が無いものを「0」と表記している。

ジャポニカとインディカの鎖長分布の相違の一つの典型例として、ジャポニカの整理番号 143 (以下 #143 と記載する。) とインディカの整理番号 303 (#303) についての鎖長分布を第 5 図に示す。第 5 図の上段の図 (第 5 図 A) は各々の鎖長の分布を示し、横軸は鎖長 ($\alpha - 1$, 4-鎖における $\alpha - 1$, 4-グルコースの数) を示し、縦軸は頻度 (モル%) を示す。白抜きはジャポニカ (#143) を示し、黒塗りはインディカ (#303) を示す。第 5 図の下段の図 (第 5 図 B) は、各々の鎖長におけるジャポニカ (#143) の頻度からインディカ (#303) の頻度を引いた (#143 - #303) 差を頻度 (%) として示している。

この結果、ジャポニカは、インディカに比べて鎖長が 11 以下のものが多く (第 5 図 B において大きくプラスになっている。)、鎖長が 12 ~ 24 のものがすくなくなっている (第 5 図 B において大きくマイナスになっている。) ことがわかる。また、鎖長が 25 以上のものについては両者に殆ど差がないことがわかる。この結果は以前の報告とよく一致するものであった。

さらに、いくつかの種類のイネについてインディカ (#303) との鎖長の分布の差を同様にしてみてもみた結果を第 6 図に示す。第 6 図は左側の上から #103 との差、#234 との差、#310 との差、及び #409 との差を示し、右側

は#215との差、#202との差、#302殿差、及び#408との差をそれぞれ示す。第6図の左側と右側では鎖長分布の差のパターンが異なっていることがわかる。即ち、左側のパターンは前記したジャポニカ（#143）との差のパターンとよく似ているが、右側のパターンは鎖長分布に差が余りみられない、即ちインディカ#303とほぼ同じ鎖長分布をしているパターンとなっている。

本発明者らは、さらに、鎖長が24以下の全量に対する鎖長が10以下の量の比（以下、本明細書ではこの比をACRと称する。）を計算してみた。各品種のこの値は前記表1～表4に記載されている。

第7図は今回調査した129品種について算出されたACRの値におけるヒストグラムを示している。横軸はACRの値を示し、縦軸は出現頻度を示している。

この結果から、ACRの値に基づいてイネを大きくふたつのグループに分類できることがわかる。ひとつのグループはACRが0.159～0.200のグループであり、他のひとつのグループは0.240～0.287のグループである。しかし、唯1種だけがこの分類に適合しないのものがあある。これはACRの値が0.220の#215のクークヨエ（Khauk Yoe）である。この1品種を除けば、今回調査した129品種のうちの128品種はACRの値に基づいて2グループに完全に分類し得ることがわかる。

第8図は今回調査した各種類のイネについて第7図と同様にヒストグラム化したものである。第8図に左上は温帯ジャポニカ（Temperate Japonica）のものであり（個数は47）、右上は熱帯ジャポニカ（Tropical Japonica）のものであり（個数は34）、左下はインディカのものであり（個数は23）、右下は中国のインディカのものである（個数は25）。

これによれば、温帯ジャポニカ（Temperate Japonica）は典型的にACRの値が大きいものであり（第8図左上）、熱帯ジャポニカ（Tropical Japonica）では両者のグループが存在し（第8図左上）、インディカや中国のインディカではACRの値が小さいものが主流ではあるが、ACRの値が大きいものも有ることがわかる。

本発明者らは、前記したACRの値に基づくグループを、Lタイプ、Sタイプ及びMタイプと命名した。即ち、Lタイプは短い鎖長の分布が少なくA

C R の値が小さい（約 0.19 以下）もののグループであり、S - タイプは比較的長い鎖長の分布が多く A C R の値が大きい（約 0.24 以上）もののグループである。M - タイプはその中間のものであり、今回の調査では # 215 の 1 種のみである。

振り返って第 6 図を見ると、第 6 図の左側の 4 種は、いずれも S - タイプに属するイネである。これらの 4 種は、今までの種類分けでは、温帯ジャポニカ（# 103）、熱帯ジャポニカ（# 234）、インディカ（# 310）、及び中国のインディカ（# 409）に分類されているものであるが、前記の A C R の値や第 6 図に示される鎖長分布の差からみればこれらが同種のアミロペクチン構造をゆわいていることがわかる。第 6 図の右側の上は M - タイプの # 215 のものであり、この品種は A C R の値は L - タイプとも S - タイプとも異なっているが、鎖長の分布は比較的 S - タイプに似ている。第 6 図の右側の下 3 個は L - タイプのものである。これらの L - タイプのものの鎖長の差の分布はさまざまパターンをしめしているが、いずれの鎖長においても # 303 との差が小さいことが特徴である。

各品種の胚乳のデンプンの熱特性を示差熱量測定法（D S C, Differential Scanning Calorimetry）により分析した結果を表 1～表 4 に記載した。これらの幾つかの品種について更に詳細な熱特性を検討した結果を次の表 5 に示す。

表 5

#	品種名	T _g (°C)	T _p (°C)	T _c (°C)	糊化範囲(°C)	ΔH (J/g)	Apのタイプ	アミロース含有量(%)
103	Araki	58.3	65.8	74.4	16.1	7.27	B	20.0
143	Talchung 65	59.6	67.2	75.3	15.7	6.26	B	21.1
202	Basllanon	68.0	72.9	78.9	10.9	7.56	A	21.5
215	Khauk Yoe	61.1	69.9	80.8	19.7	8.74	C	24.3
234	Vista	60.3	67.5	77.6	17.3	8.21	B	15.7
302	Chinsurah Boro 2	67.7	72.9	78.6	10.9	7.98	A	26.7
303	Co13	67.1	72.0	79.2	12.1	9.18	A	32.3
310	IR28	57.0	64.7	74.1	17.1	6.54	B	31.7
408	Duan Guang Huo Luo	68.3	73.1	80.4	12.1	8.47	A	31.6
409	Gul Zhao2	53.1	60.7	70.2	17.1	6.03	B	33.1

表 5 の左側から、整理番号、品種名、糊化開始温度 (T_o)、糊化最大温度 (T_p)、糊化終了温度 (T_c)、糊化範囲、ゲラチン化エンタルピー、前記した ACR の値によるタイプ (A_p)、アミロース含有量 (%) を示している。この結果 L-タイプのアミロペクチンを有するイネのデンプンの糊化開始温度 (T_o) 及び糊化最大温度 (T_p) は、S-タイプのものに比べて極めて高くなっていることがわかる。また、M-タイプのものはこの中間となっていることがわかる。

アミロペクチンの微細構造とデンプンの熱特性の相関をさらに詳細に検討した結果を第 9 図に示す。第 9 図の横軸はデンプンの糊化開始温度 (T_o (°C)) を示している。縦軸はアミロペクチンの DP が 10 以下の量の比 (ACR) を示している。第 9 図の黒菱形印 (◆) は温帯ジャポニカを示し、黒四角印 (■) は熱帯ジャポニカを示し、黒三角印 (▲) はインディカを示し、バツ印 (×) は中国インディカをそれぞれ示している。温帯ジャポニカは比較的左上側に集中しているが、他の種類はバラバラの分布している。しかし、糊化開始温度が高くなるにつれて ACR の値が小さくなることが明瞭に示めされており、その相関係数は -0.8025 と極めて高い相関が両者にあることを示している。

このことから、アミロペクチンの ACR の値がデンプンの熱特性に大きな影響を与えていることがわかる。

アミロペクチンのクラスターの側鎖は、DP が約 10 以上のものであればダブルヘリックス構造を形成しており、このダブルヘリックス構造の長さが糊化開始温度 (T_o) と相関していることが報告されている (T. Umemoto, et al., Theor. Appl. Genet., 2001, in press.; M. J. Gidley, et al., Carbohydr. Res., 1987, 161, 291-300.; M. J. Gidley, et al., Carbohydr. Polym. 1995, 28, 23-31.; G. K. Moates, et al., Carbohydr. Res. 1997, 298, 327-333.)。このダブルヘリックス構造に基づく考え方によれば、ACR の値と糊化開始温度との相関を説明することができる。即ち、ACR の値が大きい (S-タイプ) ということは DP が 10 以下のものが比較的多く、ダブルヘリックス構造を形成できる側鎖が少ないということになり、反対に ACR の値が小さい (L-タイプ) ものでは DP が 11 以上のものが比較的多く、ダブルヘリックス構造を形成できる

側鎖が多くなるからである。

また、同じ A C R の値であるにもかかわらず糊化開始温度が比較的広く分布する傾向が見られる。このことは特に A C R の値が 0.24 以上の場合に顕著である。このことは、糊化開始温度が A C R の値のみに左右されるものではなく、他の要因によっても左右されていることを示していると考えられる。

次に、各種のイネの胚乳のデンプンのアミロースの含有量についても調査し、この結果を表 1 ～ 表 4 に記載した。

第 10 図は今回調査した 129 品種のうちの 100 品種についてのアミロース含有量のヒストグラムを示している。横軸はアミロース含有量（全デンプンに対する割合（％））を示し、縦軸は出現頻度を示している。

第 11 図は今回調査した各種類のイネについて第 10 図と同様にヒストグラム化したものである。第 11 図に左上は温帯ジャポニカ（Temperate Japonica）のものであり（個数は 38）、右上は熱帯ジャポニカ（Tropical Japonica）のものであり（個数は 25）、左下はインディカのものであり（個数は 19）、右下は中国のインディカのものである（個数は 18）。

アミロースの含有量が 30％を越えるものもみられたが、このアミロース含有量と前記したアミロペクチンの構造との相関は特にみられなかった。

デンプンのアミロース含有率と糊化開始温度との相関を検討した結果を第 12 図に示す。第 12 図の横軸はデンプンの糊化開始温度（ T_0 （℃））を示している。縦軸はデンプンのアミロース含有率（％）を示している。第 12 図の黒菱形印（◆）は温帯ジャポニカを示し、黒四角印（■）は熱帯ジャポニカを示し、黒三角印（▲）はインディカを示し、バツ印（×）は中国インディカをそれぞれ示している。

この結果、デンプンのアミロース含有率と糊化開始温度とには、格別の相関は見出せなかった（相関係数＝0.2460）。

本発明は、従来のインディカとジャポニカという分類法とは異なる、アミロペクチンの微細構造に基づいて L－タイプ、S－タイプ、及びそれらの中間の M－タイプという 3 種類にイネを分類することができることを見出したものである。これらのタイプにおけるアミロペクチンのクラスターの $\alpha-1, 6$ －結合による

枝の位置や数に違いは無いのであるが、ひとつのクラスターにおける短い $\alpha-1$, 4-グルコシド鎖や中間程度の長さの $\alpha-1$, 4-グルコシド鎖の数にのみ違いが見られる。このようなL-タイプとS-タイプの違いを模式的にしめしたものが図3であるということもできる。即ち、図3の(a)はひとつのクラスターの中に $\alpha-1$, 4-グルコシド鎖の短いものの数が相対的に多くなっており、これが本発明のS-タイプに相当するものであり、図3の(b)は反対にひとつのクラスターの中に比較的長い $\alpha-1$, 4-グルコシド鎖の数が相対的に多くなっており、これが本発明のL-タイプに相当するものである。従来は図3の(a)をジャボニカータイプ、(b)をインディカータイプといていたが、インディカやジャボニカの中にも品種によってL-タイプもあり、S-タイプのものもあるということアミロペクチンの微細構造の分析により初めて明らかにしたものである。

さらに、本発明者らは、日本晴(品種名)とカサラス(品種名)とのアミロペクチンの構造の相違の原因がスターチシンターゼIIa(SSIIa)の作用によるものであることを示してきた(特願2000-78553号)。即ち、本発明者らは、デンプンの性状の差異に起因すると考えられるアルカリ崩壊性の難易を制御する遺伝子(alk遺伝子)、デンプンの主要成分であるアミロペクチンの構造を制御する遺伝子、さらにアミロペクチン合成に関与すると考えられる酵素アイソザイムの構造遺伝子が同一の遺伝子座に存在することを示してきた。

本発明においては、世界中で栽培されているイネについて、同じ方法によりアミロペクチンの構造が変化させられていることを明らかにし、そして、イネ胚乳におけるSSIIaの作用がアミロペクチンのクラスター内における短い鎖の伸長に決定的な役割を演じていること、及びSSIIa遺伝子が欠損した場合にはL-タイプのアミロペクチンに代わってS-タイプのアミロペクチンが蓄積されることを示してきた。

このことから、前記してきたアミロペクチンの微細構造におけるL-タイプとS-タイプの構造を決定する遺伝子はスターチシンターゼIIa(SSIIa)をコードする遺伝子であると考えられることから、当該遺伝子を単離することを試みた。

このために、まず、リン(Lin)らの方法に準じて(Lin, et al., 1998))、98

系統の（日本晴×カサラス）×日本晴の戻し交雑後代自殖系統群（Backcross Inbred Lines, B I L s）を育成した。98系統のB I L sは、各々の系統について、12本ある染色体のどの領域が日本晴あるいはカサラス由来であるかが明らかにされている（イネゲノムプロジェクト公開データ、<http://www.staff.or.jp>）。この遺伝子データと各B I Lのアルカリ崩壊性の難易を対応させることにより、アルカリ崩壊性を制御する遺伝子の座乗位置が決定可能である。この解析を実施した結果、アルカリ崩壊性遺伝子は既報（Haruahima et al., 1998）の通り、第6染色体のポジション（position）36.7に座乗することが確認された。

次に、アミロペクチンの枝状構造を制御する遺伝子の染色体上の座乗位置を決定するために、前記の各B I L sのアミロペクチンの構造を前述した方法により分析し、それらの鎖長分布が日本晴のそれに類似しているかカサラスのそれに類似しているか判定した。その判定結果とB I L sの遺伝子型データを対応させることで、アミロペクチンに枝状構造を制御する遺伝子は1つ存在し、前記のアルカリ崩壊性遺伝子と同じく、第6染色体のポジション（position）36.7に座乗することが明らかとなった。

また、イネS S I I a遺伝子の構造を明らかにするため、イネゲノムDNAのサザンブロット解析を行った。まず、ジャポニカ品種の日本晴とインディカ品種のカサラスのゲノムDNAを幼葉から単離し、その一部をエッペンドルフチューブ内でそれぞれ各B a m H I、B g l II、E c o R V、H i n d III、A p a I、D r a I、E c o R I、K p n Iの各制限酵素で加水分解した後、精製したDNA断片をアガロース電気泳動によって分離した。分離DNAをフィルターに転写し、全長E S Tクローン（E 1 1 0 2 5）をプローブとしてして、サザンブロットを行った。その結果、B a m H I断片において、反応する断片が、イネの両品種においてR F L P性が認められた。これを利用して、B I L s各系統を、日本晴型（20 kbの断片を含む）、カサラス型（23 kbの断片を含む）、ヘテロ型（20 kbおよび23 kbの断片を含む）の3つのタイプに分類し、イネS S I I a遺伝子のマッピングを行った。その結果、B I L s系統間におけるR F L Pパターンの挙動は、アルカリ崩壊性とすべて一致した。従って、イネS S I I a遺伝子は、a l k遺伝子と同一かあるいは極めてその近傍に座乗すると結論し

た。

なお、イネ胚乳のESTクローン（E11025）は、農林水産省農業生物資源研究所イネゲノム研究チームより分譲された。本クローンは、ジャポニカ型イネ品種である日本晴の未熟種子のmRNAを鋳型にし、ポリTをプライマーとして、リバーstransクリプターゼの作用によって作成したcDNAを、5'末端と3'末端にSalIとNotI認識塩基配列をそれぞれ付加して、プラスミドベクターpBluescript II SK+ (Stratagene)にサブクローニングしたものである。本プラスミドはさらに大腸菌JM109株に感染させ、形質転換された大腸菌はグリセロールストックして保存してある。本菌体を、50mg/mlのアンピシリンを含むLB培地（1l当たり1%バクトトリプトン、0.5%イーストエキストラクト、1%塩化ナトリウムを含む）上にまき、35℃で終夜培養した。得られたコロニー群からシングルコロニーを選び、このコロニーからQiagenキット（アミコン、USA）によってプラスミドDNAを調製した。このプラスミドを、HindIII、KpnI、EcoRI、XhoI、SacIによって加水分解した後、1%アガロース電気泳動によりDNA断片を分離し、それぞれの長さを測定して、本クローンの制限酵素地図を作成した。

本クローンは全長約1.7~1.8kbであった。上記制限酵素によって得られる数種類のDNA断片を1%アガロース電気泳動で分離した後、ゲルネブライザー（Gel Nebulizer）（アミコン、USA）によって精製し、それぞれpBluescript II SK+ (Stratagene)のそれぞれの制限酵素に対応する部位にサブクローニングした。サブクローニングされたクローンを含むプラスミドは大腸菌JM109株に感染させ、形質転換された大腸菌はグリセロールストックして保存してある。E11025クローン全体およびクローンの断片を含むプラスミドの塩基配列を、ジデオキシ法に基づいて、Dye Primer Cycle Sequencing FS Ready Reactionキット（PEバイオシステムジャパン、千葉県浦安市）および蛍光DNAシーケンサー（PEバイオシステムジャパン、Model373S-36型）を用いて、決定した。各クローンの両側からの塩基配列を求めるため、M13フォワードプライマーおよびリバープライマーを用いた。得られた塩基配列を、核酸およびアミノ酸配列の解析ソフト（Genetyx、ソフトウェア開発、東京）を用いて解析した。

その結果、本ESTクローンは1,724塩基からなり、466アミノ酸をコードすると考えられた。

このようにして決定されたイネのSSIIa遺伝子を含むゲノムの断片が調製された。日本晴 (Nipponbare) のSSIIa遺伝子については、独立行政法人・農業生物資源研究所イネゲノム研究チームが調製したSSIIa遺伝子を含む2種類のPACクローン (P441, P450) を使用した。また、カサラス (Kasalath) のSSIIa遺伝子については、同じく独立行政法人・農業生物資源研究所イネゲノム研究チームが調製したSSIIa遺伝子を含むBACクローンを使用した。

これらのPACクローン、BACクローンを種々の制限酵素 (EcoRV、EcoRI、PstI、KpnI、SalI等) で加水分解した。それぞれの断片を、プラスミドベクター (pBluescript SK+) にサブクローンした後、プラスミドDNAを調製し、それぞれのDNA塩基配列を、ジデオキシ法によってDNAシーケンサーで決定した。

得られた日本晴とカサラスのスターチシンターゼIIa (starch synthase, SSIIa) 遺伝子の構造を第13図に示す。また、日本晴の塩基配列を配列表の配列番号1に、カサラスの塩基配列を同配列番号2に示す。また、日本晴のエキソン部分の塩基配列を配列表の配列番号3に、カサラスのものを配列番号4にそれぞれ示す。さらに、日本晴のSSIIaのアミノ酸配列を配列表の配列番号5に、カサラスのものを配列番号6にそれぞれ示す。

第13図の四角枠はエキソン領域を示し、四角枠の間はイントロンを示す。それぞれの番号は、エキソン及びイントロンの順序を示している。第13図中のアスタリスクは、アミノ酸が変わる部分を示している。第13図には併せて制限酵素による切断位置を示す。

日本晴の遺伝子のエキソン及びイントロンの位置、数およびサイズを次の表6に、カサラスのそれを表7にそれぞれ示す。

表 6

日本晴							
エキソン	開始番号	終了番号	塩基長(bp)	イントロン	開始番号	終了番号	塩基長(bp)
1	1342	1773	432	1	1774	1902	129
2	1903	2575	673	2	2576	2674	99
3	2675	2739	65	3	2740	3428	689
4	3429	3506	78	4	3507	3588	82
5	3589	3699	111	5	3700	3804	105
6	3805	3849	45	6	3850	4265	416
7	4266	4439	174	7	4440	4906	467
8	4907	5863	957				

表 7

カサラス							
エキソン	開始番号	終了番号	塩基長(bp)	イントロン	開始番号	終了番号	塩基長(bp)
1	1332	1763	432	1	1764	1892	129
2	1893	2565	673	2	2566	2664	99
3	2665	2729	65	3	2730	3419	690
4	3420	3497	78	4	3498	3579	82
5	3580	3690	111	5	3691	3795	105
6	3796	3840	45	6	3841	4257	417
7	4258	4431	174	7	4432	4899	468
8	4900	5856	957				

それぞれの表は、左から、エキソン又はイントロンの番号、その領域の開始番号、その領域の終了番号、及びその領域の塩基長を示す。

日本晴とカサラスの S S II a 遺伝子は、いずれも 7 個のイントロンによって分断されている 8 個のエキソンから成る。イントロンの数と位置は両者で同一である。ただし、イントロンの長さは、第 3、第 6、第 7 イントロンにおいて、カサラスの遺伝子の方が 1 塩基ずつ長い。イントロンの塩基配列の相同性もかなり高いが、第 3、第 6、第 7 イントロンにおいては、比較的多数の違いが見られる。

第 14 図～第 18 図に、日本晴とカサラスの S S II a のゲノム遺伝子の全塩基配列を比較して示している。第 14 図～第 18 図の各行の上段が日本晴のものであり、下段がカサラスのものである。第 14 図はこのうちの 1 番目～1260 番目（上段の日本晴による番号）までの比較を示し、第 15 図はこのうちの 1261 番目～2520 番目（上段の日本晴による番号）までの比較を示し、第 16 図はこのうちの 2521 番目～3779 番目（上段の日本晴による番号）までの比較を示し、第 17 図はこのうちの 3780 番目～5037 番目（上段の日本晴による番号）までの比較を示し、第 18 図はこのうちの 5038 番目～5935 番目（上段の日本晴による番号）までの比較を示している。

全配列のうちのプロモーター部分は、日本晴では 1～1,341 bp であり、カサラスでは 1～1,331 bp である。このプロモーター部分では、カサラスには、中ほどに（702 bp）9 塩基のギャップがある程度で、両者のサイズや塩基配列の相同性はかなり高かった。

8 個のエキソンのサイズは両者間で全く差がない（表 1 参照）。エキソン部分の塩基配列の比較を第 19 図～第 20 図に示す。第 19 図～第 20 図の各行の上段が日本晴のものであり、下段がカサラスのものであり、転写開始点を 1 番にしている。第 19 図はこのうちの 1 番目～1260 番目までの比較を示し、第 20 図はこのうちの 1261 番目～2607 番目までの比較を示している。エキソン部分の塩基配列の違いは合計で 6 箇所ある（図 15 中の矢印）。

第 21 図に両者の S S II a のアミノ酸配列の比較を示す。第 21 図の各行の上段が日本晴のものであり、下段がカサラスのものである。日本晴とカサラスの S S II a 遺伝子をもとに、両者の S S II a のアミノ酸配列を比較すると、4 箇所に

において、アミノ酸の種類が異なっていた。これらの違いによって酵素機能の違いが生じる可能性が考えられる。

興味ある事に、4箇所のアミノ酸置換のうち、737番目のアミノ酸配列が、カサラスではV（バリン）のところ、日本晴ではM（メチオニン）となっている。スターチシンターゼのアミノ酸配列中にはいくつかの保存領域が知られているが、そのうちの1つがV G G L R D T V（アミノ酸配列730－737）で植物のスターチシンターゼにおいて高度に保存されていて、リージョン7（Region7）と命名されている（Li et al., (1999) Plant Physiol. 120: 1147-1155）。イネSSIIaにおいて、737番目のアミノ酸がカサラスではVで保存されているのに対して日本晴ではMに変化している。この変化がSSIIaの機能の低下に関係している可能性がある。

ジャポニカイネとインディカイネのデンプンの主成分であるアミロペクチンの構造の差異は、両者のSSIIa遺伝子の構造と機能の違いが原因であると考えられる。具体的には、ジャポニカイネのSSIIa遺伝子の機能が、何らかの変異によって、劣っていると考えられる。その原因としては、遺伝子の発現量が顕著に低下したか、酵素としての触媒能が低下したかのいずれかであろうと思われる。前者はプロモーターの変異によって、後者はアミノ酸置換による変異によって引き起こされる可能性が高い。

この結果として、ジャポニカイネはアミロペクチンを構成するクラスターの鎖長が短い、即ちACRの値が大きいSタイプとなり、インディカイネは鎖長が長い、即ちACRの値が小さいLタイプとなったと考えられる。

本発明者らはこれを確認し、さらに遺伝子の導入によるデンプンの製造を確認するために、インディカイネの1種である品種IR36のデンプン合成酵素IIa（SSIIa）遺伝子を、ジャポニカイネに属する品種金南風（Kinmaze）にグルテリン（イネの貯蔵タンパク質）のプロモーターに連結させてアグロバクテリウムにより導入した。その結果、品種IR36のデンプン合成酵素IIa（SSIIa）がジャポニカイネに属する品種金南風（Kinmaze）で発現し、当該形質転換体においては、本来Sタイプのアミロペクチンになるべきものが、形質転換によりLタイプに変化したことが確認された。この結果を第22図に示す。第22図は、

各品種が製造するデンプン（アミロペクチン）のDP（ α -1, 4-グルコシド鎖における α -1, 4-グルコースの数）を測定した結果を示したものである。第22図の上段は品種金南風（Kinmaze）のものであり、中段は品種IR36のものであり、下段は形質転換体#78-1のものである。中段及び下段の右側は、各品種の品種金南風（Kinmaze）との差を示している。即ち、中段の右側は各DPにおける品種金南風（Kinmaze）と品種IR36との差を示したものであり、下段の右側は各DPにおける品種金南風（Kinmaze）と形質転換体#78-1との差を示したものである。

この結果は、形質転換体において、品種IR36のDP値を持ったデンプンが製造されていることを示している。

イネのデンプンの熱特性などの物性や味覚を決めているがデンプンのアミロペクチンの微細構造の違いによるものである。世界で栽培されているイネのアミロペクチンの微細構造は、L-タイプとS-タイプ、それとその中間のM-タイプに分類されることを本発明が初めて示し、そしてアミロペクチンのこれらの構造の違いを生じさせている原因遺伝子がスターチシンターゼIIa（SSIIa）であることを本発明が示し、この遺伝子を単離し塩基配列を決定した。

その結果、L-タイプのイネ（カサラス）とS-タイプのイネ（日本晴）では、遺伝子の塩基配列の相違は少しであったが、この少しの違いがアミロペクチンの微細構造の違いを生じさせているのである。

アミロペクチンのクラスターの合成は、枝作り酵素（SBE）により短い枝の分岐が作られ、デンプン合成酵素（SS）によりクラスターの結晶領域の終端まで鎖が伸長される。クラスター中における短い鎖の割合は、枝作り酵素（SBE）と合成酵素（SS）の活性のバランスによって決定される。S-タイプのアミロペクチンは、SSIIa遺伝子が障害を受けているために、その結果SBE活性がSS活性に比べて相対的に高くなったときに製造されると思われる。これに対してL-タイプ様のアミロペクチンは、クラスターの形成に当たってSSIIa活性がSBE活性に比べ優位であることから、SSによる短い枝の伸長が優勢となったときに製造されるものと思われる。

このように、アミロペクチンのクラスターにおける微細構造の形成は、クラス

ターの枝の元となる分岐の形成とSSIIaなどによる鎖の伸長とのバランスによるものであるから、SSIIaの活性発現が障害を受けて弱くなっていると考えられるS-タイプのイネのSSIIaの遺伝子を、他のタイプのイネに導入することにより、導入されたイネのSBEとSSIIaの活性のバランスが微妙に崩れ、アミロペクチンのクラスターが新しいタイプの微細構造を有するデンプンを製造することができることになる。

また、発育のよいイネに物性や味覚の好ましいデンプンを作るSSIIa遺伝子又はそのプロモーターを導入することにより、環境に強くかつ好ましい物性や味覚を有するデンプンを作るイネに改善することも可能となる。

本発明における遺伝子は、翻訳領域のみをコードする遺伝子であってもよいし、ゲノム由来のものであってもよいし、また場合によってはプロモーター領域を含むものであってもよい。

また、本発明のプロモーターとしては、イネのSSIIa遺伝子を発現させることができるものであればよいが、好ましくは配列表の配列番号1の1番目～1,341番目のもの、又は配列番号2の1番目～1,331番目のものが挙げられる。本発明のプロモーターは、これらの塩基配列の全部又はその一部を用いることができる。

本発明のイネの改変方法において重要なことは、遺伝子を導入するということではなく、アミロペクチンの微細構造を改変するためにイネのSSIIaの活性に関連する遺伝子を操作するということである。したがって、本発明の遺伝子改変イネは、イネのSSIIaをコードする遺伝子の全長又は部分長のものをイネのゲノムに導入する方法に限定されるものではなく、イネのSSIIaの活性を変化させる目的でイネゲノムのSSIIa遺伝子部分の塩基配列を、ポイントミューテーション法などにより操作することも本発明の方法に包含される。

本発明の遺伝子改変イネの形態としては、遺伝子が導入などにより改変されたことを判別できるものであればよく、例えば種子、カルス、生育体などのいずれの形態であってもよい。

本発明のデンプンの製造方法は、前記した遺伝子改変イネを用いてアミロペクチンの微細構造やそれに伴う物性や味が元のイネとは異なるデンプンを製造する

方法であり、アミロペクチンの微細構造はイネの枝作り酵素（SBE）の活性とデンプン合成酵素（SS）の活性とのバランスによるものと考えられることから、本発明の遺伝子やプロモーターを用いてSSの活性を変化させることにより、イネにおけるSBEとのバランスを微妙にかえることが可能となり、目的に適した特性を有するデンプンを製造することが可能となる。

また、本発明は、前記した製造方法によりアミロペクチンの $\alpha-1, 4$ -グルコース鎖の鎖長分布や物性が元のイネとは異なる新規なデンプン、より詳細には天然のイネ科植物が産生するデンプンとは鎖長分布や物性の異なる新規なデンプンを提供することもできる。

さらに、本発明はアミロペクチンの微細構造を特徴づけることができるSSIIaの遺伝子の全塩基配列、及びその相関関係を明らかにするものであり、本発明の塩基配列を用いてイネのSSIIaをコードする遺伝子の種類を検出、同定することが可能となる。したがって、本発明はこのような方法に使用されるオリゴヌクレオチドを提供するものである。本発明のオリゴヌクレオチドは、PCRなどを行うためのプライマーや、塩基配列の相違を検出するためのプローブとして使用することができる。好ましいプライマーの例としては次の塩基配列を有するプライマー1～3が挙げられる。

プライマー1： 5'-cggtgggtgtgccctaagg-3'

プライマー2： 5'-cgacggggcagaaaggggig-3'

プライマー3： 5'-ggcggacatggctctcttcac-3'

これらのプライマーのうち、プライマー1とプライマー3の組み合わせ、プライマー2とプライマー3の組み合わせにより、イネのSSIIa遺伝子に特異的な断片を含むDNAを得ることができる。

本発明のSSIIaをコードする遺伝子又はそのプロモーターを用いることにより、イネのデンプンのアミロペクチンの $\alpha-1, 4$ -グルコース鎖の鎖長分布を調節又は制御することができ、したがって、本発明はイネのSSIIaをコードする遺伝子又はそのプロモーター領域の塩基配列を改変することによる、アミロペクチンの $\alpha-1, 4$ -グルコース鎖の鎖長分布を調節又は制御する方法を提供するものである。

第9図に見られるように、アミロペクチンの鎖長分布と糊化開始温度とには強い相関関係があり、特に、アミロペクチン短鎖の比率の増加により（S-タイプ）、糊化開始温度が低下し、易糊化性が示される。このことは、アミロペクチンの分子構造の改変が、デンプンの物性を変える手段のひとつであることを示している。

したがって、本発明はこのような鎖長分布の制御によって、熱糊化特性の異なる新規なデンプンを提供することができるものでもあり、食品用デンプンや産業用デンプンとして新規かつ有用なデンプンを提供するものである。

2. デンプン枝作り酵素IIb（BEIIb）による改変

次に、デンプン枝作り酵素IIb（BEIIb）について説明する。

本発明者らは、イネのBEIIb遺伝子が欠損したae変異体（amylose-extender(ae)の変異体）の解析から、BEIIbの機能を検討する過程において、ae変異体にイネのBEIIb遺伝子を形質転換し、デンプンの性質が野生型に回復するかを検証することにより、BEIIbの特異的な機能の解析を行ってきた。

そのために、まずBEIIbの遺伝子を次のようにして単離した。

イネのゲノムDNAライブラリーとして、イネ品種「シモキタ」のBAC（Bacterial Artificial Chromosome）ライブラリー（Nakamura et al., (1997) Mol. Gen. Genet. 254:611 - 620.）を利用した。このBACライブラリーは、マイクロプレートサイズのメンブレンに固定したもので、ゲノムDNAはイネ品種「シモキタ」の緑葉のプロトプラストから調製したものであり、平均インサートサイズは155kbである。

このBACライブラリーから、イネのBEIIbゲノミック遺伝子をコードするクローンをスクリーニングするために、BEIIbのcDNAをプローブとして用いた。イネ品種フジヒカリのBEIIbのcDNAをPstIで切断し、その結果得られた1740bpのDNA断片を、アガロースゲル電気泳動した後、抽出、精製した。このDNA断片を、ECL法（Amersham）によりラベルし、プローブとして用いた。

BACライブラリーのメンブレンを上述のBEIIbのcDNA断片プローブと

ハイブリダイゼーションさせた結果、プローブとハイブリダイズするシグナルを得た。そのシグナルに対応するプラスミドを保持する大腸菌のクローンを得て、それをLB液体培地（クロラムフェニコール 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む）で一晩培養し、プラスミド自動抽出機によりプラスミドを抽出した。

前述のようにBACライブラリーの平均インサートサイズは155 kbであり、そのような長いDNA断片には複数の遺伝子が存在することも考えられる。BE IIb遺伝子がコードされている領域のみを得る必要があることから、ポジティブクローンから得たプラスミドについてサザンブロット解析を行なった。

このプラスミドを制限酵素Sal Iで切断した後、アガロースゲル電気泳動し、ナイロンメンブレンにDNA断片を転写させ、上述のプローブを用い、前記したECL法により、メンブレンとハイブリダイゼーションさせた。その結果、プローブは17 kbのDNA断片とハイブリダイズした。そのDNA断片を単離するために、プラスミドをSal Iで切断した後、低融点アガロースゲルで電気泳動し、目的の17 kb断片を含む領域のゲルを切り出し、目的のDNA断片を抽出、精製した。

アグロバクテリウムを介してイネに遺伝子を導入させるためにバイナリーベクターpCAMBIA1300を用いた。これをまず、Sal Iで切断した後、Sal Iを失活させた。次に、Sal I切断により生じた5'末端を脱リン酸化させた。続いて、BE IIbのcDNAプローブとハイブリダイズした17 kbのDNA断片をサブクローニングするために、これをバイナリーベクターpCAMBIA1300にライゲーションした後（これをpCBE IIbと呼ぶ。）、大腸菌株DH10B（GIBCO）を形質転換した。LB寒天培地（カナマイシン50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む）に生えた大腸菌をLB液体培地（カナマイシン50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む）で一晩培養し、プラスミドを抽出、精製した。

このバイナリーベクターにサブクローニングした17 kb DNA断片の制限酵素地図を決定し、断片化した後、塩基配列を解析した。その結果、17 kbゲノムDNA断片には、BE IIb遺伝子の完全長がコードされており、BE IIbのcDNAの塩基配列との比較により、BE IIbゲノミック遺伝子は22エキソン、21イントロンからなることが明らかになった。また、このDNA断片には、遺

伝子上流域が約 2.2 kb 存在し、プロモーター領域は全て含まれていると考えられた。さらに、下流域は約 3 kb 存在し、ターミネーター領域は全て含まれると考えられた。そこで、pCAMBIA1300 サブクローニングした BEIIb 遺伝子をコードする 1.7 kb DNA 断片をイネに導入した。

アグロバクテリウムを介した形質転換法により、上述のバイナリーベクターにサブクローニングした BEIIb 遺伝子を、イネ a e 変異体である EM10 (Yano et al., (1985) Theor. Appl. Genet. 69:253-257.) に導入し、形質転換体を作製した。このイネ a e 変異体である EM10 は、イネ品種「金南風」を親株とした変異体として作成されたものである。

イネの組織培養および形質転換は土岐(Toki)の方法 (Toki, (1997) Plant Mol. Biol. Reporter, 15:16-21.) に準じて行った。まず、pCBEIIb をエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 株に導入した。このアグロバクテリウムを EM10 のカルスに感染させ、DNA 導入し、形質転換させた。形質転換体は、ハイグロマイシンによりスクリーニングした。植物体に再分化したイネ個体はポットに移植し、温室で、自然光、28/24℃ (6 - 18 時 / 18 - 6 時) の条件で生育させた。

このようにして得られた形質転換体の中から、6 系統を選抜した。この 6 系統を、#7-8、#9-8、#106-1、#31-1、#113-7、及び #1-1 と命名した。

これらの 6 系統の形質転換体の中から #106-1、#31-1、#113-7、及び #7-8 についてサザンブロット (Southern blot) 解析を行った結果を図面に代わる写真として第 23 図に示す。対照として a e 変異体である EM10 及びその親株である「金南風」 (Kinmaze) を用いた。第 23 図は左から「金南風」 (Kinmaze)、EM10、#106-1、#31-1、#113-7、及び #7-8 の各レーンを示し、第 23 図の上段の (a) は BamHI を用いた場合であり、下段の (b) は HindIII を用いた場合である。

選抜した形質転換体は、金南風、EM10 よりも強くプローブとハイブリダイズした (第 23 図ではより黒く示されている。)。アプライしたゲノム DNA 量は同じであるから、形質転換体には、金南風、EM10 以上の BEIIb をコード

するDNA断片が存在する。つまり、BEIIbを含む断片が導入されていることを示している。

次に、得られた形質転換体についてノーザンブロット (Northern blot) 解析を行った結果を第24図に図面に代わる写真として示す。第24図の左から、「金南風」(Kinmaze)、EM10、#106-1、#31-1、#113-7、#7-8、ひとつ間を置いて、#1-1、#2-6、及び#9-8の各レーンを示し、縦方向はデンプンを製造する際の各デンプン合成酵素、及びrRNA (リボソームRNA) を示している。BEIはデンプン枝作り酵素Iを、BEIIaはデンプン枝作り酵素IIaを、SSIはデンプン合成酵素Iを、SSIIIはデンプン合成酵素IIIを、ISAはイソアミラーゼを、PULはプルラーゼを、それぞれ示している。

BEIIbのmRNAは形質転換体#106-1、#31-1、#113-7、及び#1-1で発現していた。導入したBEIIbが確かに発現していることを示している。他のデンプン合成酵素の発現には変化が無かった。#106-1よりも#31-1、#113-7の方がmRNAが多く発現しているのは、導入されたBEIIbのコピー数に比例していると思われる。

また、#1-1において強く発現しているのは、遺伝子の強い発現を促すゲノムにBEIIb遺伝子が挿入されたためと考えられる。

これらの6系統についてウェスタンブロット (Western blot) / 活性染色法による解析 (第25図上段)、及びネイティブPAGE / BE活性染色法による解析 (第25図下段) を行った結果を第25図に図面に代わる写真として示す。第25図の上段の左から「金南風」(Kinmaze)、EM10、#7-8、#9-8、#106-1、#31-1、#113-7、及び#1-1の各レーンを示し、縦方向はBEI及びBEIIbのプロットを示す。第25図の下段の左から「金南風」(Kinmaze)、EM10、ae変異型、相補型 (Complement型)、過剰発現型 (Over expression型) を示し、縦方向はBEIIa、BEIIb、及びBEIをそれぞれ示す。

BEIIbのタンパク質は、親株の金南風、並びに形質転換体#106-1、#31-1、及び#113-7で発現していることが確認できた。特に#1-1で

は強く発現していた。しかし、a e 変異体の E M 1 0 及び形質転換体 # 7 - 8 ではその発現を確認することはできなかった。他のデンプン合成酵素 (B E I、I S A 及び P U L) の発現にはいずれの個体においても変化がみられなかった。

B E I I b 活性は、a e 変異体の E M 1 0 では見られないが、親株の金南風では紫色のバンドとして見られる。形質転換体では、B E I I b 活性が # 1 0 6 - 1、# 3 1 - 1、及び # 1 1 3 - 7 で回復しているが、# 1 0 6 - 1 では非常に薄く確認できた。# 7 - 8 は回復していなかった。この結果、形質転換体 # 1 0 6 - 1、# 3 1 - 1、及び # 1 1 3 - 7 では、導入した B E I I b が発現し、機能していることが示された。

次に、形質転換イネのアミロペクチンの分子構造について検討した。各形質転換体及び a e 変異体の E M 1 0 について、アミロペクチンの鎖長の分布を野生型 (金南風) の鎖長分布と比較した。結果を第 2 6 図に示す。第 2 6 図の横軸は鎖長の長さを 1 ~ 6 0 まで示しており、数字が大きいほど鎖長が長いものを示している。第 2 6 図の縦軸は各鎖長における野生型 (金南風) との鎖長分布の割合 (%) の差を示している。即ち、まず野生型 (金南風) におけるアミロペクチンの鎖長の分布を調べ、それをアミロペクチンの鎖長全体に対する各鎖長の割合 (%)、例えば鎖長 6 のものが a %、鎖長 7 のものが b %、鎖長 8 のものが c %、鎖長 9 のものが d %、・・・というように各鎖長について全体に対する分布の割合 (%) を算出する。次に検定すべき各形質転換体などについて同様にアミロペクチンの鎖長全体に対する各鎖長の割合 (%)、例えば鎖長 6 のものが k %、鎖長 7 のものが l %、鎖長 8 のものが m %、鎖長 9 のものが n %、・・・というように各鎖長について全体に対する分布の割合 (%) を算出する。そして、各鎖長についてその差、例えば、鎖長 6 のものでは (k - a) %、鎖長 7 のものでは (l - b) %、鎖長 8 のものでは (m - c) %、鎖長 9 のものでは (n - d) %、・・・というように各鎖長の分布の割合 (%) の差を算出し、それをグラフ化したものが第 2 6 図である。第 2 6 図の縦軸における + 側 (第 2 6 図では上側) は野生型 (金南風) よりも多く分布していることを示し、- 側 (第 2 6 図では下側) は野生型 (金南風) よりも少なく分布していることを示している。また、第 2 6 図の上段は、E M 1 0 (黒丸印 - ● -)、形質転換体の相補型 (Complement

型) (# 1 0 6 - 1) (白丸印-○-)、並びに a e 変異型 (# 7 - 8) (黒三角印-▲-) 及び a e 変異型 (# 9 - 8) (黒四角印-■-) についてのものであり、第 2 6 図の下段は、形質転換体の過剰発現型 (Over expression型) (# 3 1 - 1) (黒丸印-●-)、形質転換体の過剰発現型 (Over expression型) (# 1 1 3 - 7) (黒四角印-■-)、及び形質転換体の過剰発現型 (Over expression型) (# 1 - 1) (黒三角印-▲-) についてのものである。

B E I I b を欠く a e 変異体の E M 1 0 では、鎖長の短い部分 (鎖長が約 6 ~ 1 3) において野生型 (金南風) に比べて分布の割合 (%) が低くなっており、鎖長の長い部分 (鎖長 1 5 以上の部分) において分布の割合 (%) が高くなっている。これは、枝作り酵素 I I b (B E I I b) の活性が低いためにアミロペクチンの枝分かれが少なくなり、それに伴って鎖長が長くなってきたものと考えられる。これに対して枝作り酵素 I I b の遺伝子が導入されて、それが発現している形質転換体については、その発現の程度に応じて鎖長の分布が変化していることがわかる。通常であれば、欠失した酵素の遺伝子が導入されたとしても、元の野生型に戻る程度の酵素活性が復元されるのであり、第 2 6 図に示される各鎖長の分布の割合 (%) の差が 0 になるところで酵素活性が飽和すると考えられるのであるが、本発明の枝作り酵素 I I b (B E I I b) については、過剰な酵素活性が見出された。即ち、第 2 6 図の下段に示されるように、鎖長の短い部分 (鎖長が約 3 ~ 1 2) において野生型 (金南風) に比べて分布の割合 (%) が極端に高くなっており、鎖長の長い部分 (特に、鎖長が 1 2 ~ 2 4 の部分) において分布の割合 (%) が低くなっている。

これは、枝作り酵素 I I b (B E I I b) の活性が、遺伝子の過剰な発現により、その活性が高くなり、アミロペクチンの枝分かれがより促進され、それに伴って鎖長が比較的短くなってきたものと考えられる。

形質転換体として選抜された 6 系統について、それらの鎖長分布を解析した結果から、これらの 6 系統を以下の 3 グループに分類することができた。これらの 3 グループを以下のように命名した。これらの型の名称を第 2 6 図に示している。

- (1) a e 型：枝作り酵素 I I b (B E I I b) の活性が回復されていない、あるいは、わずかに回復しているタイプ。

・・・形質転換体 # 7 - 8、及び # 9 - 8

(2) 相補型 (CO型) : 枝作り酵素 IIb (BEIIb) の活性が、ほぼ回復されたタイプ。

・・・形質転換体 # 106 - 1

(3) 過剰発現型 (OE型) : 導入した BEIIb 遺伝子が過剰に発現しているタイプ。

・・・形質転換体 # 31 - 1、# 113 - 7、及び # 1 - 1

第 26 図に示される鎖長の分布による前記 3 グループの分類は、前記した第 23 図～第 25 図における BEIIb 遺伝子についてのバンドの濃淡としても明瞭に示されている。例えば、第 23 図においても、形質転換体 # 7 - 8 は細いバンドであるが、形質転換体 # 106 - 1 は少し太いバンドとなり、形質転換体 # 31 - 1 及び # 113 - 7 ではかなり太いバンドとなっておりである。

これらにことから、形質転換体に導入された枝作り酵素 (SBE) の遺伝子の発現量と、当該形質転換体が生産するデンプンのアミロペクチンの鎖長の分布とに密接な関連性があることが初めて見出された。

次に、これらの形質転換体が生産するデンプンの特性を調べた。これらの形質転換イネのデンプンの熱糊化特性及び種子の重量をまとめて次の表 8 に示す。

系統	糊化開始温度 To (°C)	糊化ピーク温度 Tp (°C)	糊化終了温度 Tc (°C)	糊化熱量 ΔH (mJ/mg)	種子重量 (mg/seed)
EM10	69.6±0.8	77.1±0.5	85.1±0.4	7.11±0.26	17.4±0.5
#7-8	69.2±0.1	77.3±0.1	86.2±0.7	7.29±0.56	17.6±0.9
#9-8	66.1±0.5	72.5±0.0	79.2±0.2	6.75±0.23	17.5±1.1
#106-1	61.2±0.3	68.3±0.7	76.2±0.7	5.78±1.04	22.1±1.1
金南風	56.5±0.4	64.5±0.1	72.1±0.2	5.85±0.90	23.5±1.6
#31-1	55.4±0.8	63.4±0.7	71.8±0.9	5.95±0.79	20.3±0.9
#113-7	52.6±0.6	60.7±0.4	68.4±0.4	5.72±0.09	22.8±0.8
#1-1	42.8±0.4	53.3±0.4	63.9±0.4	1.11±0.22	7.7±1.4
参考(sugary-1変異体)					
EM935	37.1	53.1	65.1	1	11.0±0.9
EM653	36.7	47.3	60.8	1.19	—

* 3回反復の平均値 (種子量は20粒の平均値) とStandard errorを示す (参考をのぞく)。

表 8 に糊化特性として、糊化開始温度 T_o (°C)、糊化ピーク温度 T_p (°C)、糊化終了温度 T_c (°C)、糊化熱量 (mJ/mg) を示す。また、参考例としてイソアミラーゼ (ISA) 遺伝子が欠損したイネ *sug-1* 変異体が生産するデンプンの糊化特性を示している。種子重量は、20 粒の平均値を mg で示している。

これらのデンプンの糊化特性の結果は、以下のように分析することができ、前記した鎖長の分布に基づく 3 グループの結果と密接な関連性があることがわかった。

- 1) *ae* 型の形質転換イネ系統は、*ae* 変異体と同様の糊化特性を示した。BEI I b 活性がわずかに回復している #9-8 では、やや金南風に近い特性を示した。
- 2) CO 型の形質転換イネは糊化温度は金南風よりやや高い値を示した。糊化熱量には変化がなかった。
- 3) OE 型は金南風より糊化温度が低く、その程度は鎖長分布が金南風に対して激しければ糊化温度も低かった。糊化熱量には変化が見られなかった。#1-1 は金南風に比べて糊化温度が 10°C 以上も低下しており、糊化熱量も 5 分の 1 以下であった。

以上の結果から、*ae* 変異体の原因酵素が BEI I b であることが明確になった。また、形質転換イネの中には過剰発現系統が出現し、それらの糊化特性は *sug-1* 変異体と類似しており、BEI I b とイソアミラーゼ (ISA) は、アミロペクチンの微細構造に対して相反する効果を示す可能性が示された。

これらの変異体が製造したデンプンを走査型電子顕微鏡で観察した。これらの 6 系統の形質転換体及びそれらの親系統の胚乳からデンプン粒を精製し、走査型電子顕微鏡でそれらの形態を観察した。結果を図面に代わる写真により第 27 図として示す。第 27 図の上段は 1000 倍に拡大した場合を示し、下段は 4000 倍に拡大した場合を示している。それぞれの写真の白いバーはスケールを示している。第 27 図の各段の左から EM10、#7-8、#9-8、#106-1、その下段の左から金南風 (Kinmaze)、#31-1、#113-7、及び #1-1 をそれぞれ示している。

金南風 (Kinmaze) は、幅が約 $5\ \mu\text{m}$ のほぼ均一な多角形のデンプン粒であるが、EM10 のデンプン粒は、幅 $10\ \mu\text{m}$ を越す大きな粒がところどころに存在し、それ以外の小さな粒は、金南風 (Kinmaze) よりも小さく、多角形の角が崩れた形をしていた。また、互いの粒が接着し、群をなしていた。このような EM10 でみられた傾向は #7-8 でも見られ、#9-8 及び #106-1 へと緩和される傾向が見られた。BEIIb が過剰発現している系統である #31-1 は、金南風 (Kinmaze) と非常に類似していたが、#113-7 では、多くのデンプン粒は、大きさ、形態は金南風 (Kinmaze) とかわらないものの、わずかに形が崩れ、小さくなった粒も見られた。#1-1 では、金南風 (Kinmaze) でみられたようなデンプン粒はごくわずかであり、多くのデンプン粒が崩れて $1\ \mu\text{m}$ ほどの大きさであり、形も不均一であった。

さらに、これらの新規なデンプン類の X 線回折パターンを調べた。これらの 6 系統の形質転換体のうち、デンプン粒が十分に取れなかった #1-1 を以外と、それらの親系統の胚乳からデンプン粒を精製し、それぞれの X 線回折パターンを調べた。結果を第 28 図に示す。第 28 図の縦軸は強度 (cps) を示し、横軸は回折角度 (2θ) を示す。第 28 図の上から EM10 (A)、#7-8 (B)、#9-8 (C)、#106-1 (D)、金南風 (Kinmaze) (E)、#31-1 (F)、及び #113-7 (G) をそれぞれ示す。

これらのデンプン粒の X 線回折パターンは、大きく分けて A 形と B 形に分けられた。一般にデンプン粒の X 線回折パターンは、禾穀類のデンプンは A 形を示し、芋類は B 形を示し、豆類は両者の混合パターンである C 形を示す。これは、デンプン分子の結晶中の水分子の挿入位置の違いによるとされている。また、X 線回折パターンのピークの高さは、結晶性の高さを示すとされている。トウモロコシの BEIIb 変異体 (ae mutant) は、その野生型が A 形を示すにも関わらず、B 形を示すことが知られている。

イネにおいても、EM10 は典型的な B 形デンプンのパターンを示した。形質転換体では、BEIIb の発現量が多くなるに従って B 形から A 形のパターンに移行していた。また、過剰発現型の #31-1 は、金南風 (Kinmaze) と同様のパターン、ピークを示したが、#113-7 は、ピークが低くなっており、結晶性の

低下が見られた。

以上のことから、デンプンを生産する生物、好ましくは植物、より好ましくはイネのデンプンの枝作り酵素IIbの遺伝子の発現量に応じて、元の野生型の生物が生産するデンプンとは異なる形質を有するデンプンを製造することがわかった。BEIIb遺伝子の導入により、アミロペクチンの鎖長分布を改変することができることも確認された。これらのデンプンは、構造的にはアミロペクチンの鎖長の分布において元の野生型の生物が生産するデンプンとは明らかに相違するものであり、またその特性、例えば糊化特性においても元の野生型の生物が生産するデンプンとは明らかに相違するものであった。

また、これらの結果から、元の野生型の生物におけるデンプンの枝作り酵素IIb (BEIIb) の遺伝子の発現量を変化させることにより、元の野生型の生物が生産するデンプンの形質を改質することができ、BEIIb遺伝子の発現の程度によって鎖長を連続的に変化させることができることも明確になった。鎖長分布の変化に伴ってデンプンの糊化特性、デンプン粒の形態、デンプンの結晶性に影響を与えることも明確となり、これらの変化も鎖長分布の変化に連動して連続的であり、このことはBEIIb遺伝子の発現量を調節することにより、好みの物性や結晶性をもったデンプンを創製することができることを示している。

したがって、本発明は、元の野生型の生物に比べて、デンプン合成に関与する酵素を過剰に発現させる方法を提供するものであり、また、新規な形質の異なるデンプンを生産する有用な変異体生物体、及びそれを製造する方法を提供するものである。

本発明におけるデンプンを生産する生物としては、デンプン枝作り酵素II型を有するものであるが、好ましくは植物、より好ましくは米、ムギ、トウモロコシなどの穀物植物、さらに好ましくはイネが挙げられる。

本発明のデンプンの枝作り酵素の遺伝子の発現量としては、元の野生型のものに比べて多くても少なくてもよく、目的とするデンプンの形質に応じて適度の発現量を有するものを選択することができる。デンプンのアミロペクチンの枝分かかれは、枝作り酵素による枝分かかれの促進作用と、イソアミラーゼなどの枝切り分解酵素による枝分かかれの抑制作用とのバランスによるものと考えられることから、

枝分かれの少ないアミロペクチンはイソアミラーゼなどの枝切り分解酵素の活性化などによっても製造可能であるが、アミロペクチンの枝分かれ構造が適度に多い鎖長の比較的短いものの分布が適度に多いデンプンは、本発明の方法により初めて製造できるものであることから、枝作り酵素の発現量が過剰となる場合がより好ましい。

本発明におけるデンプンの枝作り酵素の発現量を元の野生型と相違させる手段としては、前記した実験による方法、即ち当該酵素の遺伝子が欠損した変異体に当該酵素の遺伝子を導入し、この形質転換体から発現量の多い又は少ない形質転換体を選別する方法が好ましいが、野生型に当該酵素の遺伝子をさらに導入して過剰発現を誘発する方法など他の手段を採用することも可能である。

また、本発明におけるデンプンの形質としては、糊化特性や鎖長の分布を例示してきたが、これらに限定されるものではなく、デンプンの枝作り酵素の発現量に応じて変化する形質であれば特に制限はない。

3. デンプン枝切り酵素イソアミラーゼのプロモーターによる改変

次に、デンプン枝切り酵素イソアミラーゼのプロモーターについて説明する。

本発明者らは、イネ (*Oryza sativa* L.) のイソアミラーゼの精製、その cDNA 構造について報告してきた (N. Fujita, et al., *Planta*, 208, 283-293 (1999))。この報告では全長の cDNA は明らかにされていないが、このイソアミラーゼの遺伝子がイネの第 8 染色体に位置していることを明らかにしてきた。

一方、川崎らは、平均インサートサイズ 155 k B、7 ゲノム相当のイネのゲノム (約 450 MB / ゲノム) の BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ライブラリーを完成させ、これを公開してきた (川崎ら、*バイオサイエンスとインダストリー*、第 55 巻、第 7 号、487 (1997))。

そこで、本発明者らは、イネのイソアミラーゼの遺伝子の解析を進め、その結果に基づいてプローブを作成して、イネの BAC ライブラリーからイソアミラーゼのプロモーターを得ることに成功した。

ジャポニカイネ (品種キタアケ) のゲノムを平均インサートサイズ 155 k B のクローンを BAC ベクターに組み込んだニトロセルロースメンブレン 4 枚から

なるゲノミックDNAライブラリー（川崎ら、バイオサイエンスとインダストリー、第55巻、第7号、487（1997））を遺伝子の起源として用い、イネイソアミラーゼcDNA（Fujitaら、1999年）のEcoRI-EcoRI断片（1517bp）をプローブA（第29図参照）として、ニトロセルロースメンブレン1枚当たり120ngを用いて、ECL法でサザンブロッティングを行った。第29図は、イネ（Os）のイソアミラーゼ（ISA）のcDNAの#26クローン（N.Fujita, et al., Planta, 208, 283-293（1999））の制限酵素地図と本発明で使用したプローブA及びプローブBの位置を示す。プローブAはEcoRI-EcoRIの1517bpからなる断片であり、プローブBは同じくEcoRI-EcoRIからなる654bpの断片である。

その結果、ポジティブに反応する候補クローン2種類（#59、#60）を単離した（第30図参照）。第30図はイネのBACライブラリーが転写されている4枚（左からA、B、C、及びDの4枚）のニトロセルロースメンブレンを用いて、プローブAによるサザンハイブリダイゼーションを行った（ECL法）結果を示す図面に代わる写真である。第30図の左から2枚目（B）に2つのポジティブクローン（#59及び#60）が得られた（第30図のBの矢印）。

得られた2つのポジティブクローン（#59、#60）を、クロラムフェニコールを含むLB培地で大量増殖し、DNA抽出機（クラボー社製）でBAC DNAを調製した。精製したBAC DNAを、HindIII、EcoRI、XhoI、SacI、SalI、SpeI、PstI、XbaIの8種類の制限酵素を用いて、37℃、6時間加水分解し、アガロースゲルで電気泳動を行った。トランスブロッター（S&S社製）を用いてゲルのDNAをメンブレンに2時間転写し、UVクロスリンカー（ストラタジーン社製）でUV照射してDNAをメンブレンに結合させた。メンブレン当たり0.35ngの、プローブAを用いて42℃で一晩、穏やかに浸透させながらハイブリダイズさせた。ハイブリダイズさせたメンブレンを洗浄した後、2×SSCで室温で浸透しながら洗浄した。現像はアマシャム社のECLキットを用いて行った。X線フィルムへの感光時間は5分間であった。プローブAハイブリダイズさせた2日後、同じメンブレンを用いてプローブB（654bp）でも同じ条件でハイブリダイズさせた。

この結果、2つのクローンともにプローブA、Bに反応したため（第31図及び第32図参照）、これらがイソアミラーゼ遺伝子を含んでいることがわかった。

第31図は#59と#60の2つのポジティブクローンを8種類の制限酵素で切断して、プローブAを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った結果を示す図面に代わる写真である。第31図の左からHindIII、EcoRI、XhoI、SacI、SalI、SpeI、PstI、及びXbaIの8種類の制限酵素で切断した断片を示し、各々の断片は#59からのもの（各左側）と#60からのもの（各右側）を示している。第31図の左右の数値は断片の長さ（kb）を示している。

第32図は、プローブとして第29図に示すプローブBを用いた点を除き第31図と同様である。

各断片はいずれも、プローブA及びプローブBと反応していることが示された。

以上の結果を参考にして、イネイソアミラーゼ遺伝子の制限酵素地図を作製した。得られたイネイソアミラーゼ遺伝子の制限酵素地図を第33図に示す。第33図のAは第29図に示したイネのイソアミラーゼの前記cDNAに相当するゲノミックDNAであり、四角で示される部分がエキソン領域を示している。第33図のBはイネのイソアミラーゼの前記ゲノミックDNAの制限酵素地図を拡大して示している。第33図のAの左側の点線から左側の四角部分であるエキソンがプローブBに相当する領域のであり、右側の点線の右側がプローブAに相当する領域のエキソンである。第33図のCはクローン#60をいくつかの制限酵素で切断して得られた断片を示す。第33図のCは、断片E1（EcoRI-EcoRI、7.2kb）、断片SE（SalI-EcoRI、4.8kb）、断片H（HindIII-HindIII、2.4kb）、断片P（PstI-PstI、5.1kb）、断片PS（PstI-SacI、4.8kb）、及び断片E2（EcoRI-EcoRI、5.8kb）をそれぞれ示す。

また、BACクローン#60をいくつかの制限酵素で切断して得られた断片（E1（EcoRI-EcoRI、7.2kb）、SE（SalI-EcoRI、4.8kb）、H（HindIII-HindIII、2.4kb）、P（PstI-PstI、5.1kb）、PS（PstI-SacI、4.8kb）、E

2 (E o R I - E c o R I, 5.8 kb) を 0.8% 低融点アガロースで電気泳動を行った後に切り出した。タカラ社製の β -アガラーゼ I を用いて、アガロースを分解した後、マイクロコン 100 (ミリポア社製) で、溶媒交換して精製し、0.85 fmol の断片 DNA と、それぞれの制限酵素で切断した後、エピアルカリフォスファターゼ (ロッシュ社製) で脱リン酸化処理した pCambia A プラスミド 8.5 fmol とともに、TOYOBO 社製ライゲーションハイ (Ligation high) を用いて、16℃で、一晚ライゲーション反応を行った。それらをエレクトロポレーション (BTX 社製) を用いて、1.29 KV で、GIBCO 社製大腸菌 (エレクトロマックス、DH10B cell) を、25 μ l 使用) に導入して形質転換させた。得られた形質転換体を 37℃で、2日間培養した後、ブルーホワイトセレクション法で、白コロニーを選び、50 μ g/ml のカナマイシンを含む、LB 培地で大量増殖した。pCambia A プラスミドをキアゲンプラスミドキット (キアゲン社製) で精製した。

このようにして得られたサブクローリングしたクローンのうち、SE 断片 (S a l I - E c o R I, 4.8 kb) の塩基配列をABI 社製 DNA シーケンサー 370 を用いて、ダイジオキシ法で決定した。その結果、この断片はイソアミラーゼ遺伝子のプロモーター、翻訳開始、などを含んでいた。

この遺伝子からイネのイソアミラーゼ遺伝子のプロモーターを決定した。これを配列表の配列番号 7 に示す。

イソアミラーゼは、デンプンを製造するの枝分かれを分解してゆく酵素であり、生物特有のデンプンを製造するためにデンプン製造時の必要な時期に必要な量だけ発現するように制御されている。したがって、本発明のイネのイソアミラーゼ遺伝子のプロモーターは、イネ特有のデンプンを製造するために必要なイソアミラーゼの発現を制御するものであり、イネ様のデンプンを製造するに有用となる。例えば、本発明のプロモーター及びイソアミラーゼ遺伝子をイネ以外の生物に導入した場合には、イネと同様なデンプンを製造するために、デンプンの枝切り酵素であるイソアミラーゼが発現され、イネ様のデンプンをイネ以外の生物において製造することが可能となる。また、イネ以外の生物に由来するイソアミラーゼを有したまま、本発明のするプロモーター及びイソアミラーゼ遺伝子をイネ以外

の生物に導入した場合には、両者の複合された形態のデンプンを製造できる可能性もある。

このように本発明のイネのイソアミラーゼのプロモーターは、イネのデンプンを製造するために極めて重要な役割を果たすものであり、イネのデンプンの製造のみならず新規な形態を有するデンプンを製造するために極めて有用である。

本発明のプロモーターは、配列表の配列番号 7 に記載された塩基配列を有するものとして得られたが、これらの全部の配列が必要ではなく、イソアミラーゼの発現の制御に関係少ない部分の塩基配列は任意に変更することができる。

現在のところでは、どの部分がイソアミラーゼの発現の制御に重要であるかということは必ずしも明確に分析されてはいないが、転写開始コドンから上流 500 塩基、好ましくは 700 塩基～1000 塩基程度は必要であると考えられる。好ましい、塩基配列としては配列表の配列番号 7 の 2521-3288 までの塩基配列を挙げることが出来るが、これに限定されるものではない。さらに、これらの塩基配列についても、これらの塩基配列が配列表の配列番号 7 のとおりの塩基配列である必要ではなく、イソアミラーゼの発現の制御に関係少ない部分の塩基配列は任意に変更することができる。

塩基配列の変更としては、配列表の配列番号 7 の塩基配列の一部を削除し、また他の塩基配列を付加し、他の塩基配列で置換するな、並びにこれらの組み合わせにより、任意にその塩基配列を変更することができる。変更の手段としては、公知の各種の手段を採用することができる。

このように変更された塩基配列を有するプロモーターも、前記した本発明のプロモーターと同種の作用効果を有する限りにおいては、本発明のプロモーターに包含されるものである。

本発明のプロモーターは、イネのイソアミラーゼ遺伝子より分離されたものであるが、イソアミラーゼ遺伝子としてはイネのイソアミラーゼ遺伝子に制限されるものではない。イソアミラーゼ遺伝子は生物種により異なっているが、本発明のプロモーターにより発現の制御が可能である限りにおいて、如何なるイソアミラーゼ遺伝子であってもよい。例えば、本発明のプロモーターをコムギのイソアミラーゼ遺伝子の上流に導入したり、他品種のイネのイソアミラーゼ遺伝子の上

流に導入することもできる。このように、本発明のプロモーターをイソアミラーゼ遺伝子を有する別の生物にそのプロモーター部分のみを導入することにより、デンプンの枝切り酵素の作用が異なった新規な形態や蓄積法をしたデンプンを得ることも可能となる。

また、本発明のプロモーターを有するイネに他の品種または植物のイソアミラーゼ遺伝子を導入して、イネに新規な形態や蓄積法をしたデンプンを製造させることも可能となる。

したがって、本発明は、本発明のプロモーターを用いて新規な形態（アミロペクチンの構造的な解析、また特性や蓄積場所や味覚などの相違により区別可能なデンプンの形態）のデンプンを製造する方法を提供することが可能となる。本発明の方法による新規なデンプンは、本発明のイネに特有なデンプンを製造するようにイソアミラーゼの発現が制御されたプロモーターと、その下流に位置するイソアミラーゼ遺伝子との組み合わせにより可能となる。

また、本発明は、本発明のプロモーターとイソアミラーゼ遺伝子が発現に適した形態で配置された遺伝子を提供するものでもある。

前記で具体的に示してきた本発明のプロモーターはジャポニカ米のプロモーターであり、ジャポニカ米のデンプンを製造に必須のプロモーターである。インディカ米は、ジャポニカ米とは異なる形態のデンプンを製造しており、これは主としてデンプンの枝切り酵素であるイソアミラーゼによるところが大きいと考えられている。勿論、両者のイソアミラーゼ酵素自体の相違によるところも考えられるが、両者のデンプンの形態の相違は、そのプロモーターの相違によるところも多い。このように、本発明のプロモーターを、デンプンの形態が異なる他品種のイネのイソアミラーゼ遺伝子の上流に導入することも極めて有用な方法である。さらに、本発明のプロモーターを、イネ以外の生物、好ましくは植物のイソアミラーゼ遺伝子の上流に導入することも考えられる。

本発明のプロモーターが結合しするイソアミラーゼ遺伝子としては、デンプンの形態が異なる他の品種のイネ、コムギやオオムギなどの他の穀物植物、イモやマメ、トウモロコシなどの雑穀植物などや、デンプンを製造する細菌類や藻類などのイソアミラーゼ遺伝子が挙げられる。

さらに、本発明の前記したイソアミラーゼ遺伝子上流に本発明のプロモーターが配置されてなる遺伝子を通常の方法によりベクターに組み込むことができ、必要に応じて当該ベクターを用いて適当な細胞を形質転換させることができる。したがって、本発明は、イソアミラーゼ遺伝子上流に本発明のプロモーターが配置されてなる遺伝子を含有してなるベクター、及びそれにより形質転換された形質転換体を提供するものでもある。形質転換される宿主細胞としては、イネやムギなどの高等植物細胞が好ましいが、これに限定されるものではなく、イソアミラーゼを発現し得る細胞であればよい。

また、本発明は、イソアミラーゼ遺伝子上流に本発明のプロモーターを配置してなる遺伝子を用いてイソアミラーゼを発現させる方法を提供する。イソアミラーゼはデンプンの製造に必要な酵素であるが、デンプンの製造に限定されるものではなく、イソアミラーゼ自体を発現させる方法であれば本発明の方法に包含されるものである。

前述してきたように、アミロペクチンのクラスター構造の微妙な相違が、デンプンの特性を大きく変化させることから（例えば、イネのジャポニカとインディカの相違を参照されたい。）、本発明のイネのイソアミラーゼ遺伝子のプロモーターは、イネ特にジャポニカ米に特有なデンプンを製造するに必要なイソアミラーゼの発現を制御できるものであり、これを用いた新品種の創製は新しいデンプンの創製に大きな役割を果たすものである。

なお、特願 2 0 0 1 - 2 7 3 1 6 6 明細書、特願 2 0 0 1 - 2 7 7 1 0 9 明細書、特願 2 0 0 1 - 2 7 7 1 2 0 明細書、及び、特願 2 0 0 1 - 2 8 7 0 1 0 明細書に記載された内容を、本明細書にすべて取り込む。

実施例

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

イネ (*Oryza sativa* L.) の種子は、独立行政法人農業生物資源研究所（筑波）のジーンバンクから譲り受けた。これらの植物は、初夏に自然の条件下で育成さ

れ、成熟種子は使用されるまで4～8℃で保存された。

実施例1 アミロペクチンの鎖長分布の分析

アミロペクチンの α -1, 4-グルカンの鎖長分布を測定するために、キャピラリー電気泳動による以下の方法により行った。

成熟乾燥種子から外内穎および胚を取り除き、乳鉢と乳棒で磨砕し、 α ポリグルカンの分子構造解析用試料とした。試料粉末5mgに5mlのメタノールを加え、10分間煮沸した。1,000xgで10分間遠心分離し、上清を除去し、90%メタノールを5ml加え二度洗浄した。沈殿に300 μ lの0.25N水酸化ナトリウムを加え、5分間煮沸してデンプンを糊化させた。糊化液を氷酢酸9.6 μ lで中和した後、蒸留水1.09ml、0.6M酢酸緩衝液(pH 4.4)100 μ l、2%アジ化ナトリウム15 μ lを加えた。P. amyloclavata イソアミラーゼ(354単位、生化学工業)6 μ lを加え、スターラーバーで攪拌しながら37℃、24時間反応させた後、20分間煮沸し、遠心分離し、上清を脱イオンカラム(AG501-X8(D), Bio-Rad)で濾過した。

蛍光標識及びキャピラリー電気泳動装置(P/ACE5000, Beckman)は、オーシーアら(O'Shea, et al)の方法に準じて行った。プロトコルはeCAP N-リンクドオリゴサッカライドプロファイリングキット(eCAP N-linked oligosaccharide profiling kit)(Beckman Coulter, California)を用いることにより製造業者から提供された。

イネの各々の品種のランダムに選択された異なる種子を用いて、少なくとも3回の別々の測定を行った。

この結果を、表1～4、並びに第5図、第6図、及び第26図に示す。

実施例2 (DSCによる熱糊化特性の測定)

各々のイネの品種から、ランダムに3粒の種子を選択し、種子から外内穎および胚を取り除き、乳鉢と乳棒で均一化した。粉末をエッペンドロフチューブ

(Eppendorf tube)にいれ、105℃で2時間加熱乾燥し、使用するまでデシケーターで保存した。デンプンの糊化特性は示差走査熱量測定(Differential Sc

ning Calorimeter ; D S C) (DSC-7, Perkin-Elmer) により行った。各々 5 m g のデンプン試料を銀製のサンプルパンに入れ、40 μ l の脱イオン水と混合し、密封した。サンプルは 3 $^{\circ}$ C / 分の速度で 10 $^{\circ}$ C ~ 120 $^{\circ}$ C まで昇温させた。

イネの各々の品種のランダムに選択された異なる種子を用いて、少なくとも 2 回、殆どの場合は 3 回の別々の測定を行った。

この結果を表 1 ~ 4、表 5、及び表 8 に示す。

実施例 3 (アミロース含有量の測定)

各々のイネの品種から、種子を選択し、種子から外内穎および胚を取り除き、乳鉢と乳棒で均一化した。得られた粉末のアミロース含有量は、アミログラフを用いて測定された。

イネの各々の品種のランダムに選択された異なる種子を用いて、少なくとも 2 回別々の測定を行った。

この結果を表 1 ~ 4、並びに第 7 図及び第 8 図に示す。

実施例 4 (殻のフェノール色素反応)

粒を室温で 1.5 % フェノール溶液に 3 ~ 6 時間浸けた。そして、穏やかに乾燥した。殻の着色を染色された染色されなかったかにかかわらず記録した。

イネの各々の品種のランダムに選択された異なる種子を用いて、少なくとも 2 回別々の測定を行った。

この結果を表 1 ~ 4 に示す。

実施例 5 (SSIIa をコードする遺伝子の単離と配列の決定)

日本晴の SSIIa 遺伝子は、独立行政法人・農業生物資源研究所イネゲノム研究チームが調製した SSIIa 遺伝子を含む 2 種類の PAC クローン (P441, P450) を使用した。また、カサラスの SSIIa 遺伝子は、同じく独立行政法人・農業生物資源研究所イネゲノム研究チームが調製した SSIIa 遺伝子を含む BAC クローンを使用した。

この PAC クローン、及び BAC クローンを種々の制限酵素 (EcoR, V,

E c o R I、P s t I、K p n I、S a l I 等) で加水分解した。それぞれの断片を、プラスミドベクター (pBluescript SK+) にサブクローンした後、プラスミドDNAを調製し、それぞれのDNA塩基配列を、ジデオキシ法によってDNAシーケンサーで決定した。

得られた日本晴とカサラスのスターチシンターゼIIa (starch synthase, S S IIa) 遺伝子の構造を第13図に示す。また、日本晴の塩基配列を配列表の配列番号1に、カサラスの塩基配列を同配列番号2に示す。また、日本晴のエキソン部分の塩基配列を配列表の配列番号3に、カサラスのものを配列番号4にそれぞれ示す。さらに、日本晴のS S IIaのアミノ酸配列を配列表の配列番号5に、カサラスのものを配列番号6にそれぞれ示す。

実施例6 (日本晴のS S IIaのcDNAの塩基配列の決定)

C a p S i t e c D N A d T (Nippon Gene社製) をDNAの鋳型として、種々のcDNAプライマーを用いて、PCR反応を行なった。PCR反応産物をプラスミドにサブクローニングし、そのDNA塩基配列を、ジデオキシ法によってDNAシーケンサーで決定した。

実施例7 (日本晴とカサラスのS S IIa 遺伝子の構造決定)

前記実施例6に記載の方法によって求められたゲノミックDNA遺伝子の塩基配列と、cDNAの塩基配列を比較する事によって、S S IIa 遺伝子のイントロン、エキソンの位置を決定した。

実施例8

(1) B A C ライブラリー

イネゲノムDNAライブラリーとして、イネ品種「シモキタ」のB A C (Bacterial Artificial Chromosome) ライブラリー (Nakamura et al., (1997) Mol. Gen. Genet. 254:611 - 620.) を利用した。このB A Cライブラリーは、マイクロプレートサイズのメンブレンに固定したもので、ゲノムDNAはシモキタの緑葉のプロトプラストから調製したものであり、平均インサートサイズ155 kbである(N

akamura et al., (1997) Mol. Gen. Genet. 254:611 - 620.)。

(2) 植物形質転換用バイナリーベクター

アグロバクテリウムを介してイネに遺伝子を導入させるバイナリーベクターとして pC A M B I A 1 3 0 0 を用いた。このベクターは C A M B I A (Canberra, Australia) のジェファーソン (Richard A. Jefferson) 博士より分与されたものである。また、このベクターは、カナマイシンおよびハイグロマイシン耐性遺伝子を保持しており、それら抗生物質をマーカーとして形質転換体をスクリーニングすることができる。

実施例 9 (B E I I b 遺伝子をコードするゲノム DNA 断片の単離)

B A C ライブラリーから、イネの B E I I b ゲノミック遺伝子をコードするクローンをスクリーニングするために、B E I I b の c D N A をプローブとして用いた。イネ品種フジヒカリの B E I I b の c D N A を P s t I で切断し、その結果得られた 1 7 4 0 b p の D N A 断片を、アガロースゲル電気泳動した後、ウルトラフリー D A (Ultrafree-DA (Millipore)) でアガロースゲルから抽出、精製した。この D N A 断片を、E C L ダイレクト核酸ラベル化及び検出システム (ECL direct nucleic acid labeling and detection system (Amersham)) によりラベルし、プローブとして用いた。ラベル化の方法は、付属の説明書にしたがった。以下に述べるハイブリダイゼーションおよびメンブレンの洗浄もこの E C L システムを利用し、方法は説明書にしたがった。

B A C ライブラリーのメンブレンを上述の B E I I b の c D N A 断片プローブとハイブリダイゼーションさせた結果、プローブとハイブリダイズするシグナルを得た。そのシグナルに対応するプラスミドを保持する大腸菌のクローンを得て、それを L B 液体培地 (クロラムフェニコール 2 5 μ g / m l 含む) で一晩培養し、プラスミド自動抽出機 (PI-100S Automatic Plasmid Isolation System, Kurabo) によりプラスミドを抽出した。

前述のように B A C ライブラリーの平均インサートサイズは 1 5 5 k b であり、そのような長い D N A 断片には複数の遺伝子が存在することも考えられる。B E

IIb 遺伝子がコードされている領域のみを得る必要があることから、ポジティブクローンから得たプラスミドについてサザンブロット解析を行なった。プラスミドを制限酵素 S a l I (ニッポンジーン) で切断した後、アガロースゲル電気泳動し、ナイロンメンブレン (Nytran, Schleicher&Schuell) に DNA 断片を転写させた。上述のプロブを用い、E C L システムにより、メンブレンとハイブリダイゼーションさせた。その結果、プロブは 1 7 k b の DNA 断片とハイブリダイズした。その DNA 断片を単離するために、プラスミドを S a l I で切断した後、低融点アガロースゲル (NUSIEVE GTG, FMC) で電気泳動し、目的の 1 7 k b 断片を含む領域のゲルを切り出し、b - アガラーゼ (ニッポンジーン) によりアガロースを分解し、DNA 断片を抽出、精製した。

実施例 1 0 (B E II b ゲノム DNA 断片のサブクロニングおよび塩基配列の解析)

バイナリーベクター p C A M B I A 1 3 0 0 を S a l I で切断した後、6 5 ℃、1 5 分の処理により S a l I を失活させた。次に、エピアルカリホスファターゼ (shrimp alkaline phosphatase (Roche)) を 3 7 ℃、1 時間反応させ、S a l I 切断により生じた 5 ' 末端を脱リン酸化させた。続いて、6 5 ℃、1 5 分の処理によりエピアルカリホスファターゼを失活させた。B E II b の c D N A プロブとハイブリダイズした 1 7 k b の DNA 断片をサブクロニングするために、S a l I 切断およびエピアルカリホスファターゼ処理した p C A M B I A 1 3 0 0 と T 4 D N A リカーゼ (ニッポンジーン) により 1 6 ℃、一晩ライゲーションした後 (これを p C B E II b とした)、大腸菌株 D H 1 0 B (G I B C O) を形質転換した。L B 寒天培地 (カナマイシン 5 0 μ g / m l 含む) に生えた大腸菌を L B 液体培地 (カナマイシン 5 0 μ g / m l 含む) で一晩培養し、クイアゲンプラスミドミディキット (QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN)) によりプラスミドを抽出、精製した。方法はキットに付属の説明書にしたがった。

このバイナリーベクターにサブクロニングした 1 7 k b D N A 断片の制限酵素地図を決定し、断片化した後、塩基配列を解析した。塩基配列の解析は、既知の方法によった (DNA sequencing kit dye primer cycle sequencing ready rea

ctionまたはDNA sequencing kit dye terminator cycle sequencing ready reaction (ともにApplied Biosystems)、並びにABI 373 DNAシーケンサー (Applied Biosystems) を用いた。得られたデータは、GENETYX-Mac バージョン10.1 (Software Development) により解析した。その結果、17 kbゲノムDNA断片には、BEIIb遺伝子の完全長がコードされており、BEIIbのcDNAの塩基配列との比較により、BEIIbゲノミック遺伝子は22エクソン、21イントロンからなることが明らかになった。

また、このDNA断片には、遺伝子上流域が約2.2 kb存在し、プロモーター領域は全て含まれていると考えられた。さらに、下流域は約3 kb存在し、ターミネーター領域は全て含まれると考えられた。そこで、pCAMBIA1300サブクローニングしたBEIIb遺伝子をコードする17 kb DNA断片をイネに導入することにした。

実施例11 (BEIIb遺伝子を導入したイネae変異体の形質転換体の作製)

アグロバクテリウムを介した形質転換法により、上述のバイナリーベクターにサブクローニングしたBEIIb遺伝子をイネae変異体であるEM10 (Yano et al., (1985) Theor. Appl. Genet. 69:253-257.) に導入し、形質転換体を作製した。イネの組織培養および形質転換は土岐 (Toki) の方法 (Toki, (1997) Plant Mol. Biol. Reporter 15:16-21.) にしたがった。

まず、pCBEIIbをエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウムツネファシエンスEHA105株 (Agrobacterium tumefaciens EHA105株) に導入した。このアグロバクテリウムをEM10のカルスに感染させ、DNA導入し、形質転換させた。形質転換体は、ハイグロマイシンによりスクリーニングした。植物体に再分化したイネ個体はポットに移植し、温室で、自然光、28/24℃ (6-18時/18-6時) の条件で生育させた。

得られた形質転換体の中から6系統を選別し、これらのサザンブロット解析の結果を第23図に示す。ノーザンブロット解析の結果を第24図に示す。また、ウエスタンブロット/活性染色法による解析の結果を第25図に示す。

さらに、これらの形質転換イネのアミロペクチンの分子構造について、それら

の鎖長分布解析の結果を第26図にグラフ化して示す。これらの形質転換イネのデンプンの熱糊化特性及び種子重量を表8に示す。

実施例12 (プローブAを用いたBACライブラリーのメンブレン上でのハイブリダイゼーション)

平均インサートサイズ155kBのクローンが転写されたジャポニカイネ(品種キタアケ)のゲノミックDNAのBACライブラリーのメンブレン4枚について、イネイソアミラーゼcDNA(Fujitaら、1999年)のEcoRI-EcoRI断片(1517bp)をプローブA(第29図参照)として、ニトロセルロースメンブレン1枚当たり120ngを用いて、ECL法でサザンブロッティングを行った。ECL法によるサザンブロッティングは、アマシャム社のマニュアルに従った。その結果、ポジティブに反応する候補クローン2種類(#59、#60)を単離した。

結果を第30図に示す。第30図の左から2枚目(B)に2つのポジティブクローン(#59及び#60)(第30図中の矢印)が見られた。

実施例13 (BACクローンのノーザンブロッティング)

実施例12で得られた2つのポジティブクローン(#59、#60)を、25 μ g/mlクロラムフェニコールを含むLB培地で大量増殖し、DNA抽出機(クラボー社製)でBAC DNAを調製した。

0.5 μ g相当の精製BAC DNAを8種類の制限酵素(HindIII、EcoRI、XhoI、SacI、SalI、SpeI、PstI、XbaI)を用いて、37℃、6時間加水分解し、0.7%アガロースゲルで電気泳動を行った。トランスブロッター(S&S社製)を用いてゲルのDNAをメンブレンに2時間転写(転写液は20 \times SSC(0.3Mクエン酸ナトリウム、3M NaCl、pH7.0))、UVクロスリンカー(ストラタジーン社製)で30秒間UV照射してDNAをメンブレンに結合させた。

メンブレン当たり0.35ngのプローブAを用いて42℃で一晩、穏やかに浸透させながらハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション用バッファー及

びプローブのラベリング試薬はアマシャム社のECLキットに従って行った。ハイブリダイズさせたメンブレンは、プライマリー洗浄緩衝液 (Primary wash buffer (Urea+)) (6 M 尿素、0.4% SDS、0.5×SSC)) で42℃で25分2回洗浄した後、2×SSCで室温で5分2回浸透しながら洗浄した。現像はアマシャム社のECLキットを用いて行った。X線フィルムへの感光時間は5分間であった。結果を第31図に示す。

プローブAでハイブリダイズさせた2日後、同じメンブレンを用いてプローブB (654bp) でも同じ条件でハイブリダイズさせた。結果を第32図に示す。

2つのクローンともにプローブA、Bに反応したため (第31図及び第32図参照)、これらがイソアミラーゼ遺伝子を含んでいることがわかった。

実施例13の結果に基づいて、イネのイソアミラーゼ遺伝子の制限酵素地図を作製した。イネのイソアミラーゼ遺伝子の制限酵素地図を第33図のBに示す。

実施例14 (BACクローン#60のサブクローニング)

BACクローン#60をいくつかの制限酵素で切断して得られた断片 (E1 (EcoRI-EcoRI、7.2kb)、SE (SalI-EcoRI、4.8kb)、H (HindIII-HindIII、2.4kb)、P (PstI-PstI、5.1kb)、PS (PstI-SacI、4.8kb)、E2 (EcoRI-EcoRI、5.8kb)) を0.8%低融点アガロースで電気泳動を行った後に切り出した。

タカラ社製のβ-アガラーゼIを用いて、アガロースを分解した後、マイクロコン100 (ミリポア社製) で、溶媒交換して精製し、0.85fmolの断片DNAとそれぞれの制限酵素で切断した後、エピアルカリフォスファターゼ (ロッシュ社製) で脱リン酸化処理したpCAMBIAプラスミド8.5fmolとともに、TOYOBO社製ライゲーションハイ (Ligation high) を用いて16℃で、一晚ライゲーション反応を行った。それらをエレクトロポレーション (BTX社製) を用いて1.29kVでGIBCO社製大腸菌 (エレクトロマックスDH10B細胞を25μl使用) に導入して形質転換させた。エレクトロポレーションには2mmのスリットの入ったキューベットを用い、プレカルチャーを

50分行った後、4% X-gal を30 μ l、0.1M IPTG を25 μ l 塗布したシャーレに菌を播いて37℃で2日間培養した。

ブルーホワイトセレクション法で白コロニーを選び、50 μ g/ml のカナマイシンを含むLB培地で大量増殖した。pCAMBIAプラスミドをキアゲンプラスミドキット（キアゲン社製）で精製した。プラスミドの精製法はキアゲンキットのマニュアルの方法で行った。

実施例15 （サブクロンのシーケンス）

実施例14でサブクローリングしたクローンのうち、SE断片（SalI-EcoRI、4.8kb）の塩基配列をABI社製DNAシーケンサー370を用いて、ジデオキシ法で決定した。シーケンス反応は、ABI社製のダイターミネーターキットを用いて行った。その結果、この断片はイソアミラーゼ遺伝子のプロモーター、翻訳開始点などを含んでいた。

得られた本発明のイネのイソアミラーゼのプロモーター部分の塩基配列を配列番号7に示す。

産業上の利用可能性

本発明は、植物のデンプン合成酵素系における酵素を遺伝子工学的に改変することにより、新規なデンプンを製造する方法、そのための遺伝子、その形質転換体、そのより製造された新規デンプンを提供するものである。デンプンは食糧として重要であるだけでなく、その糊化特性などの物性を利用した産業原料としても重要であり、本発明により提供されるデンプンは食品類のみならず、産業原料としても重要なものである。

より詳細には、本発明は、イネのデンプンにおけるアミロペクチンの微細構造と、デンプンの物性や味などの性質との相関関係を見出し、アミロペクチンの α -1,4-グリシド鎖の鎖長分布に基づいて世界中で栽培されているイネをLタイプ、Sタイプ、及びこれらの中間であるMタイプに分類されることを見出した。そして、これらのアミロペクチンの微細構造の違いがデンプン合成酵素IIa（SSIIa）の活性によるものであることを明らかにし、各タイプのSSII

a をコードする遺伝子を単離し、その構造及び塩基配列を決定した。

本発明の遺伝子を用いることにより、目的とするアミロペクチンの微細構造を有するデンプンを製造することができ、目的に応じた物性を有するデンプンを製造することが可能となる。また、本発明の遺伝子の構造や塩基配列に基づいてイネの S S II a 遺伝子を改変することにより、有用なデンプンを産生する S S II a 遺伝子が改変されたイネを提供することができ、また天然のイネとは異なる鎖長分布や物性を有する新規なデンプンを製造することが可能となり、食品や各種の産業用として新規な有用なデンプンを大量に供給することが可能となる。

また、本発明は、デンプンの生産に関与している酵素の遺伝子の発現量の相違に基づいて、生産されるデンプンの形質が異なってくることを見出したものであり、また導入した酵素の遺伝子が元の野生型よりも過剰に発現することがあることも本発明により初めて見出されたものである。

本発明は、このような新規な知見に基づいてデンプン合成酵素を天然のものよりも過剰に発現させる方法、デンプン合成酵素を天然のものとは異なる量発現する変異体、及びその製造方法を提供するものである。

本発明によれば、現存する生物の生産するデンプンを、デンプン合成酵素、好ましくはデンプンの枝作り酵素が過剰又は不足した系を生物体の中に実現することができ、それにより、元のデンプンとは形質の異なる新たな形質を有するデンプンを任意に製造することができるようになる。

さらに、本発明は、イネ、より具体的にはジャポニカ米に特有なデンプンを製造するために必要なイソアミラーゼ遺伝子のプロモーターに関するものであり、イソアミラーゼの発現をジャポニカ米に特有なデンプンを製造するために必要なように制御し得るものである。本発明のプロモーターにより、デンプンの主成分であるアミロペクチンの形態をイネのデンプンの形態に制御することが可能となり、各種の生物に本発明のプロモーターを適用することにより、デンプン合成に関与する酵素遺伝子を本プロモーターに連結することによって、イネなどの植物の胚乳に、天然には存在しない新規な物性、品質を持つデンプンを多量に合成、蓄積させることが可能となる。また、本発明のプロモーターを有するイネに、他の生物に由来するイソアミラーゼ遺伝子を本発明のプロモーターに連結すること

によって、導入遺伝子産物をイネの胚乳などに、多量に蓄積させることが可能である。

このように、本発明は、生物、好ましくは植物などのデンプンを生成する生物のデンプンの製造を制御可能にするものであり、新しいデンプンの合成や蓄積手段を提供できるものである。

請 求 の 範 囲

1. イネのスターチシンターゼIIaをコードする遺伝子。
2. イネが、ジャポニカである請求の範囲第1項に記載の遺伝子。
3. ジャポニカが、日本晴（品種名）である請求の範囲第2項に記載の遺伝子。
4. イネが、インディカである請求の範囲第1項に記載の遺伝子。
5. インディカが、カサラス（品種名）である請求の範囲第4項に記載の遺伝子。
6. スターチシンターゼIIaをコードする遺伝子が、配列表の配列番号1に示される塩基配列、又はストレージメントな条件下でそれとハイブダイズし得る塩基配列を有するものである請求の範囲第1～3項のいずれかに記載の遺伝子。
7. スターチシンターゼIIaをコードする遺伝子が、配列表の配列番号2に示される塩基配列、又はストレージメントな条件下でそれとハイブダイズし得る塩基配列を有するものである請求の範囲第1、4又は5項のいずれかに記載の遺伝子。
8. 遺伝子が、ゲノム由来のものである請求の範囲第1～7項のいずれかに記載の遺伝子。
9. 遺伝子がプロモーター領域を含有するものである請求の範囲第1～8項のいずれかに記載の遺伝子。
10. イネのスターチシンターゼIIaの遺伝子を発現させるためのプロモーター。
11. イネが、ジャポニカである請求の範囲第10項に記載のプロモーター。

12. ジャポニカが、日本晴（品種名）である請求の範囲第11項に記載のプロモーター。

13. イネが、インディカである請求の範囲第10項に記載のプロモーター。

14. インディカが、カサラス（品種名）である請求の範囲第13項に記載のプロモーター。

15. プロモーターが、配列表の配列番号1における1番目～1,341番目までの塩基配列、又はストレージメントな条件下でそれとハイブダイズし得る塩基配列を有するものである請求の範囲第10～12項のいずれかに記載のプロモーター。

16. プロモーターが、配列表の配列番号2における1番目～1,331番目までの塩基配列、又はストレージメントな条件下でそれとハイブダイズし得る塩基配列を有するものである請求の範囲第10、13又は14項のいずれかに記載のプロモーター。

17. プロモーターが、ゲノム由来のものである請求の範囲第10～16項のいずれかに記載のプロモーター。

18. 請求の範囲第1～9項のいずれかに記載された遺伝子の塩基配列、又はそれと相同性を有するようにイネのスターチシンターゼIIaをコードする遺伝子の塩基配列が改変された遺伝子改変イネ。

19. イネのスターチシンターゼIIaをコードする遺伝子の塩基配列の改変が、遺伝子の導入によるものである請求の範囲第18項に記載の遺伝子改変イネ。

20. イネのスターチシンターゼIIaをコードする遺伝子の塩基配列の改変が、プロモーター領域の塩基配列の改変である請求の範囲第18又は19項に記載の遺伝子改変イネ。

21. イネのスターチシンターゼIIaをコードする遺伝子とそのプロモーター領域の遺伝子の塩基配列の全部又は一部を、他の種類のイネのイネのスターチシンターゼIIaをコードする遺伝子とそのプロモーター領域の遺伝子の塩基配列に対応するように改変された遺伝子改変イネを用いて、元のイネとは異なる鎖長分布を有するデンプンを製造する方法。

22. イネのスターチシンターゼIIaをコードする遺伝子とそのプロモーター領域の遺伝子の塩基配列の全部又は一部を、他の種類のイネのイネのスターチシンターゼIIaをコードする遺伝子とそのプロモーター領域の遺伝子の塩基配列に対応するように改変された遺伝子改変イネを用いて、元のイネとは異なる物性や味覚を有するデンプンを製造する方法。

23. イネのスターチシンターゼIIaをコードする遺伝子の塩基配列になかの、イネのスターチシンターゼIIa遺伝子に特異的な塩基配列を含有してなるオリゴヌクレオチド。

24. オリゴヌクレオチドが、10～100塩基の長さである請求の範囲第23項に記載のオリゴヌクレオチド。

25. オリゴヌクレオチドが、次に示すプライマー1～3の

プライマー1: 5'-cggtgggtgtgccctatgg-3'

プライマー2: 5'-cgacgggcagaaaggggtg-3'

プライマー3: 5'-ggcggacatgggtctcttcac-3'

いずれかの塩基配列を有するものである請求の範囲第23又は24項に記載のオリゴヌクレオチド。

26. 請求の範囲第23～25項のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いて、イネの種類を検出又は同定する方法。

27. デンプンを生産する生物のデンプンの枝作り酵素の1種が欠損した変異体に、当該酵素をコードする遺伝子を導入して、当該酵素を元の野生型よりも過剰に発現させる方法。

28. 生物が、イネである請求の範囲第27項に記載の方法。

29. デンプンの枝作り酵素が、枝作り酵素IIb (BEIIb) である請求の範囲第27又は28項に記載の方法。

30. デンプンを生産する生物のデンプンの枝作り酵素の1種が欠損した変異体に、当該酵素をコードする遺伝子を導入して、当該酵素の発現量が元の野生型とは異なる種を選別することからなる、デンプンの枝作り酵素の1種の発現量が元の野生型とは異なる変異体を製造する方法。

31. 変異体が、当該酵素の発現量が元の野生型とは異なることにより、元の野生型の生物とは異なる形質を有するデンプンを生産する変異体である請求の範囲第30項に記載の方法。

32. 当該酵素の発現量が、元の野生型に比べて過剰量である請求の範囲第30又は31項に記載の方法。

33. 生物が、イネである請求の範囲第30～32項のいずれかに記載の方法。

34. デンプンの枝作り酵素が、枝作り酵素IIb (BEIIb) である請求の範囲第30～33のいずれかに記載の方法。

35. 請求の範囲第30～34項のいずれかに記載の方法により製造された変異体。

36. デンプンを生産する生物のデンプンの枝作り酵素の1種が、元の野生型の生物とは異なる量発現する変異体を用いて、元の野生型の生物が生産するデンプンとは異なる形質を有するデンプンを製造する方法。

37. 変異体が、デンプンを生産する生物のデンプンの枝作り酵素を過剰に発現する変異体である請求の範囲第36項に記載の方法。

38. デンプンの形質が、デンプンの糊化の特性により示されるものである請求の範囲第36又は37項に記載の方法。

39. 生物が、イネである請求の範囲第36～38項のいずれかに記載の方法。

40. デンプンの枝作り酵素が、枝作り酵素IIb (BEIIb) である請求の範囲第36～39項のいずれかに記載の方法。

41. 請求の範囲第39又は40項に記載の方法により製造されたデンプン。

42. デンプンの単位構造 (クラスター) を形成する鎖の長さが、元の野生型の生物が生産するデンプンのそれとは異なることを特徴とする請求の範囲第41項に記載のデンプン。

43. デンプンの単位構造 (クラスター) を形成する鎖の長さが、元の野生型の生物が生産するデンプンのそれよりも短いものである請求の範囲第42項に記載のデンプン。

44. デンプンを生産する生物のデンプンの枝作り酵素の1種が欠損した変異体Aを製造し、次いでこの変異体Aに当該酵素をコードする遺伝子を導入して、当該酵素の発現量が元の野生型とは異なる変異体Bを選別し、当該変異体Bを用いて元の野生型が生産するデンプンの形質を改質する方法。

45. デンプンの形質が、デンプンの糊化の特性により示されるものである請求の範囲第44項に記載の方法。

46. 変異体Bが、デンプンを生産する生物のデンプンの枝作り酵素を過剰に発現する変異体である請求の範囲第45項に記載の方法。

47. 生物が、イネである請求の範囲第44～46項のいずれかに記載の方法。

48. デンプンの枝作り酵素が、枝作り酵素IIb (BEIIb) である請求の範囲第44～47項のいずれかに記載の方法。

49. デンプンの糊化開始温度が、元の野生型の生物が生産するデンプンよりも低いデンプンである請求の範囲第44～48項のいずれかに記載の方法。

50. イネのイソアミラーゼ発現用のプロモーター。

51. 配列表の配列番号7に記載された塩基配列、又はプロモーター活性に影響を与えない範囲でその一部の塩基が置換、欠失、及び／又は付加されていてもよい塩基配列を有する請求の範囲第50項に記載のイネのイソアミラーゼ発現用のプロモーター。

52. 配列表の配列番号7における2521～3288までの塩基配列からなるものである請求の範囲第50又は51項に記載のプロモーター。

53. イソアミラーゼ遺伝子上流に請求の範囲第50～52項のいずれかに記載されたプロモーターを含有してなる遺伝子。

54. イソアミラーゼ遺伝子が、他品種のイネのイソアミラーゼ遺伝子である請求の範囲第53項に記載の遺伝子。

55. イソアミラーゼ遺伝子が、イネ以外の生物に由来するものである請求の範囲第53項に記載の遺伝子。

56. イネ以外の生物が植物である請求の範囲第55項に記載の遺伝子。

57. イソアミラーゼ遺伝子上流に請求の範囲第50～52項のいずれかに記載されたプロモーターが配置されてなる遺伝子を含有してなるベクター。

58. 請求の範囲第57項に記載のベクターで形質転換された形質転換体。

59. 宿主細胞が高等植物細胞である請求の範囲第58項に記載の形質転換体。

60. イソアミラーゼ遺伝子上流に請求の範囲第50～52項のいずれかに記載されたプロモーターを配置してなる遺伝子を用いてイソアミラーゼを発現させる方法。

61. イソアミラーゼ遺伝子上流に請求の範囲第50～52項のいずれかに記載されたイネのプロモーターを配置してなる遺伝子を植物に導入して、デンプンの製造の際のイソアミラーゼの発現がイネと同様に制御されたデンプンを製造する方法。

第 1 図

アミロース (約30-20%)



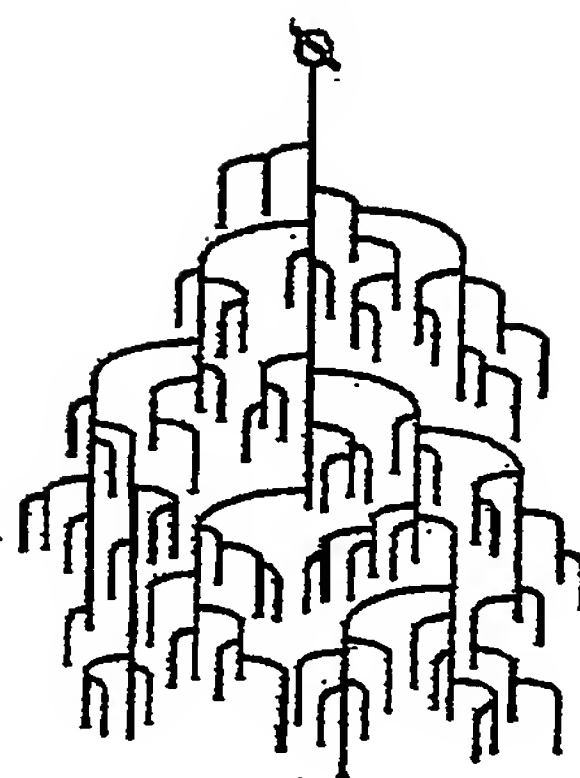
(C)

アミロペクチン (約70-80%)



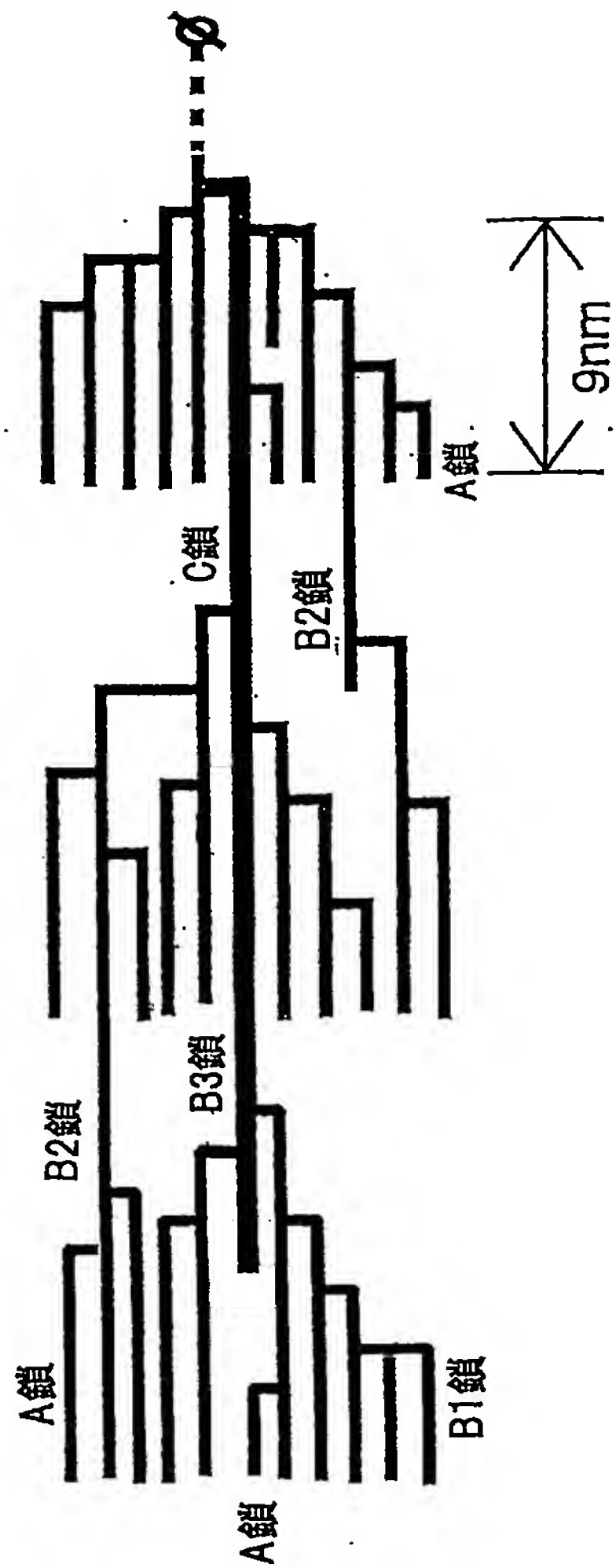
(B)

グリコーゲン

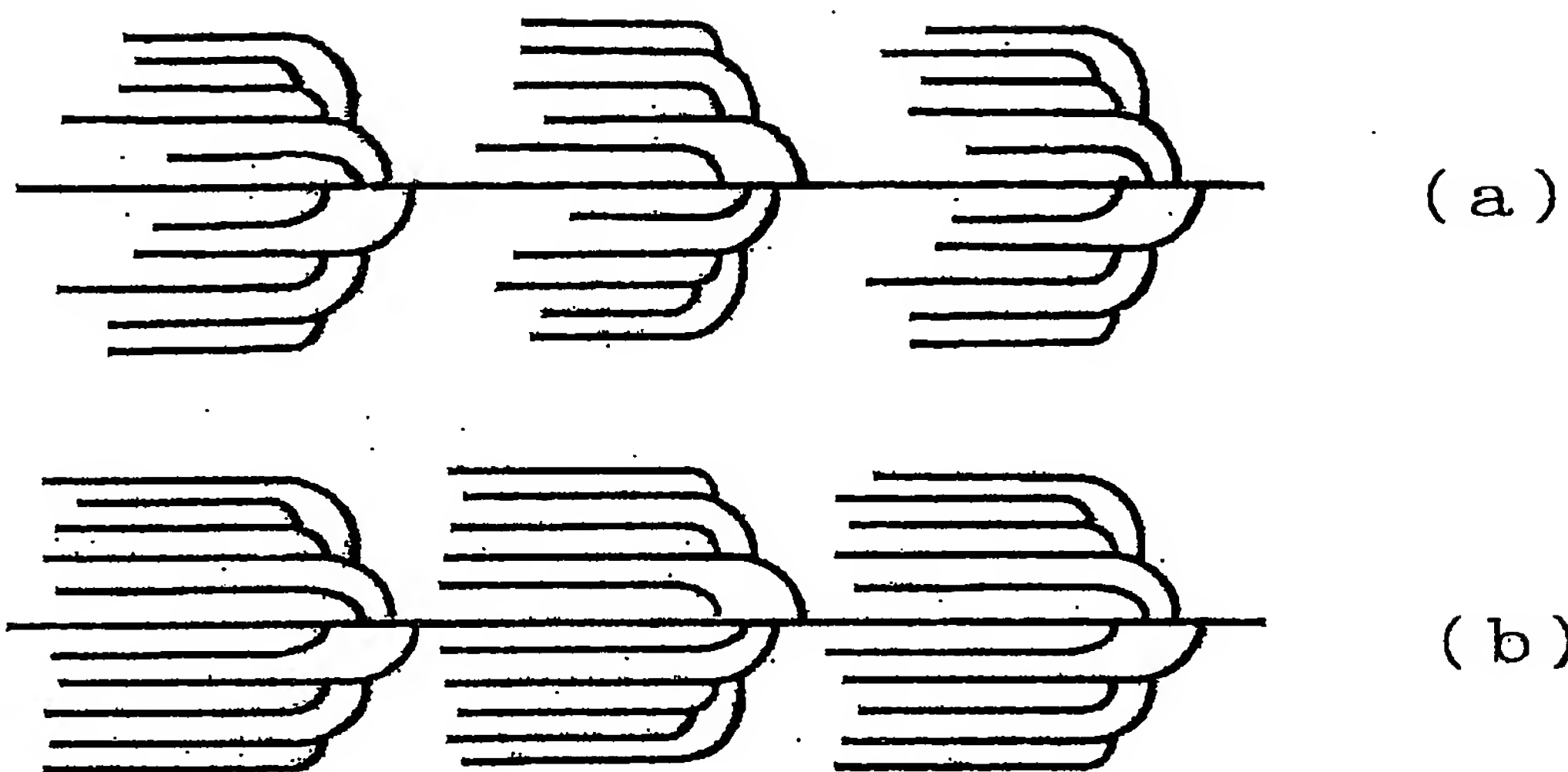


(A)

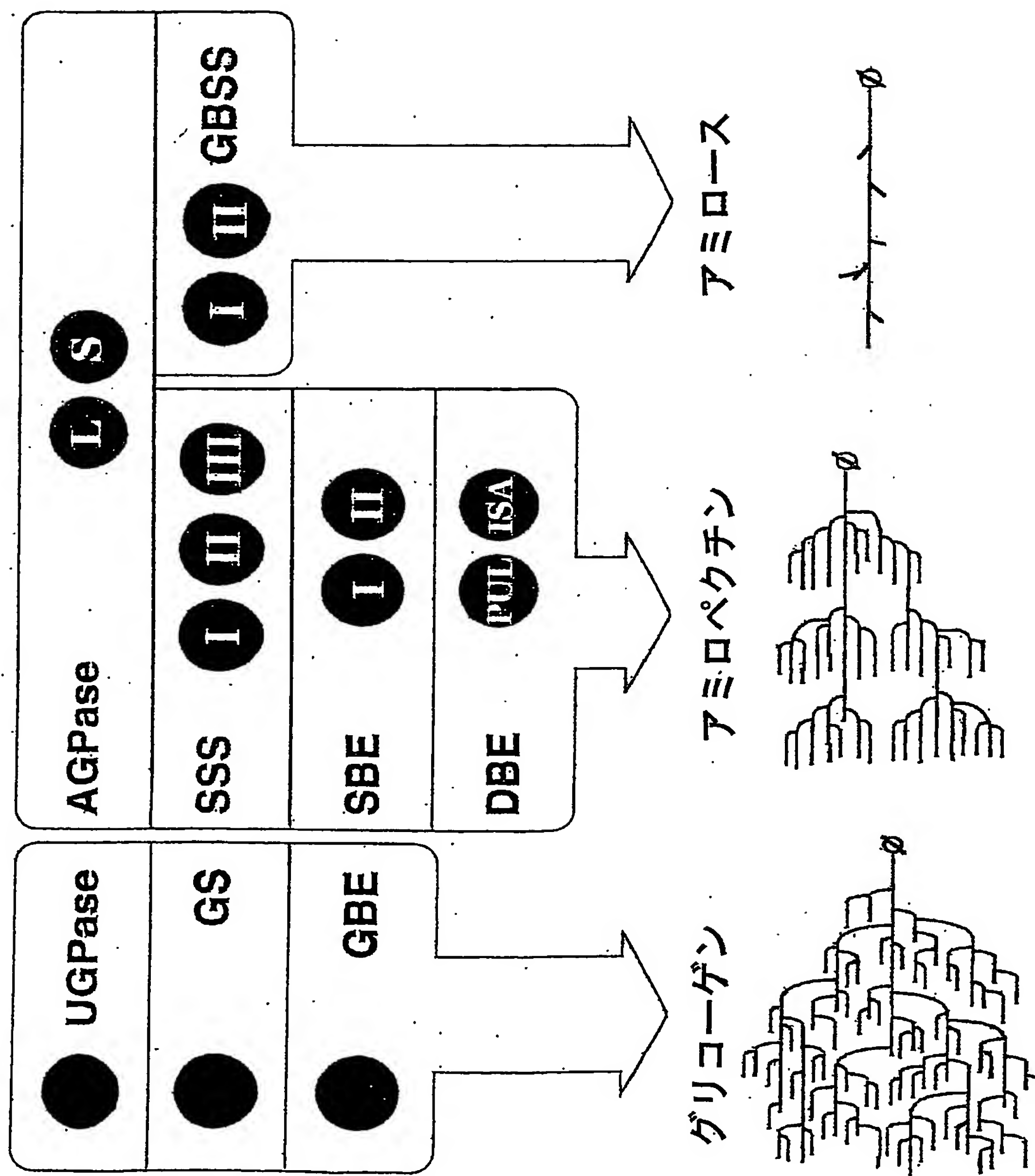
第 2 図



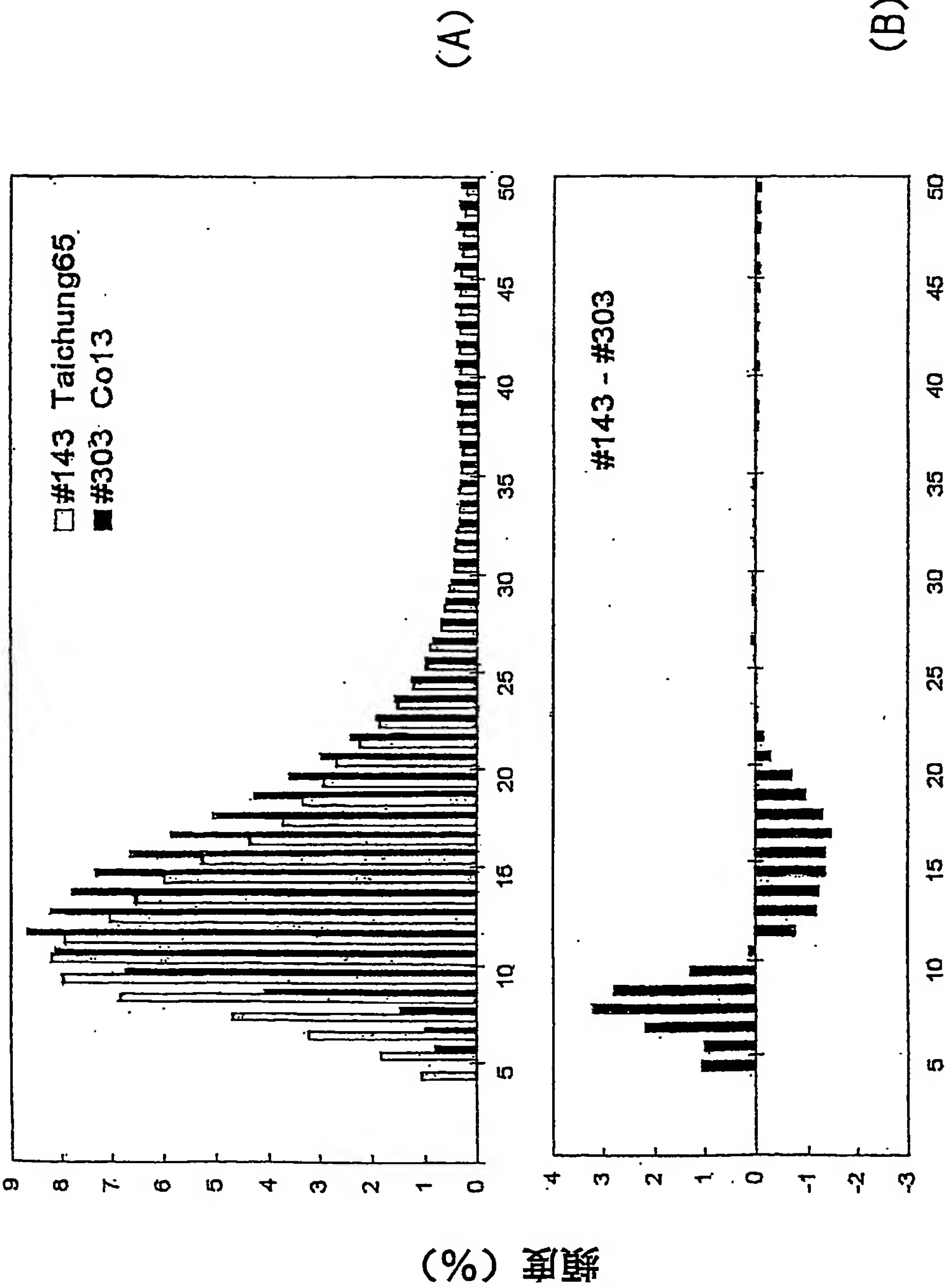
第 3 図



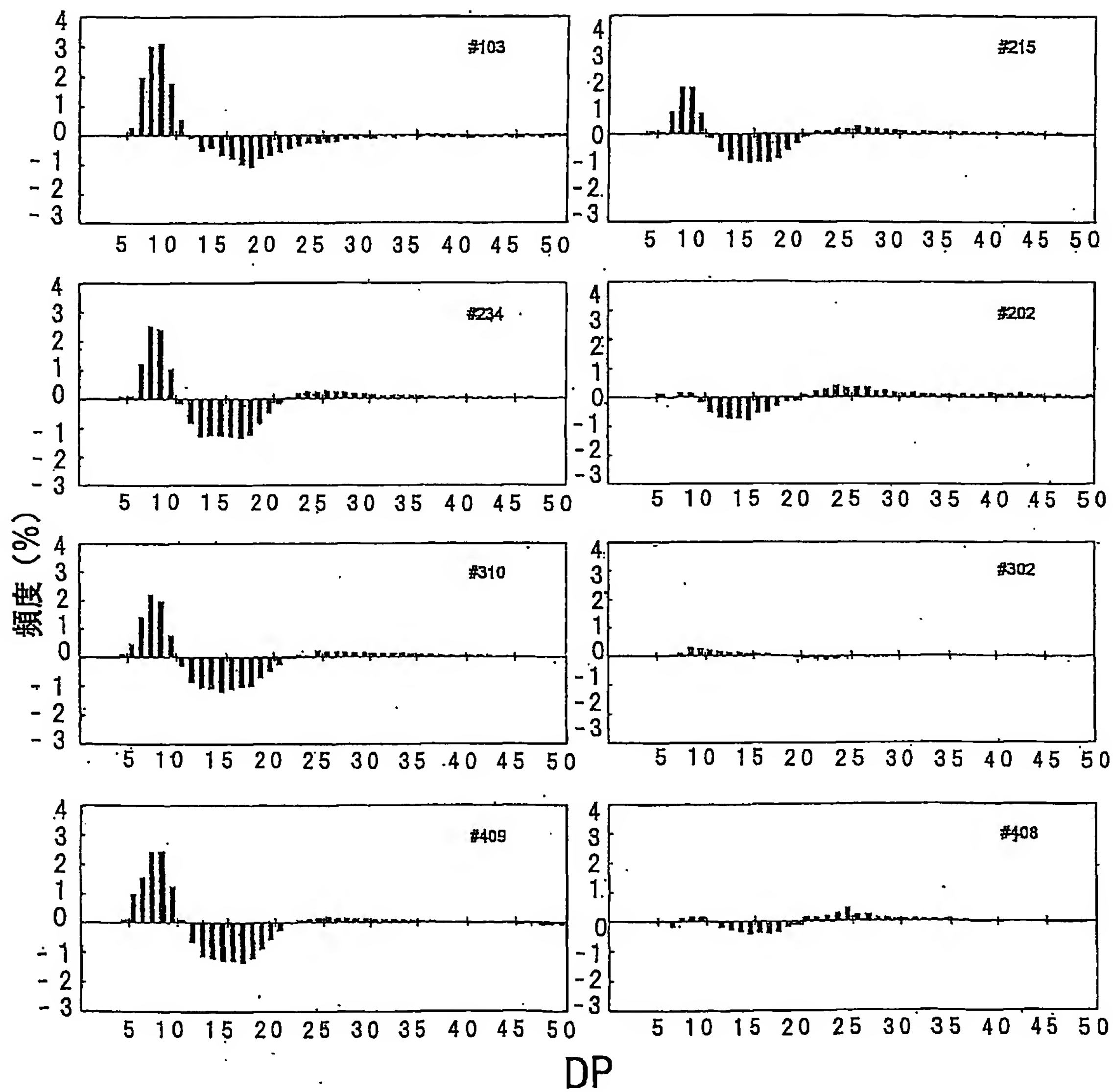
第 4 図



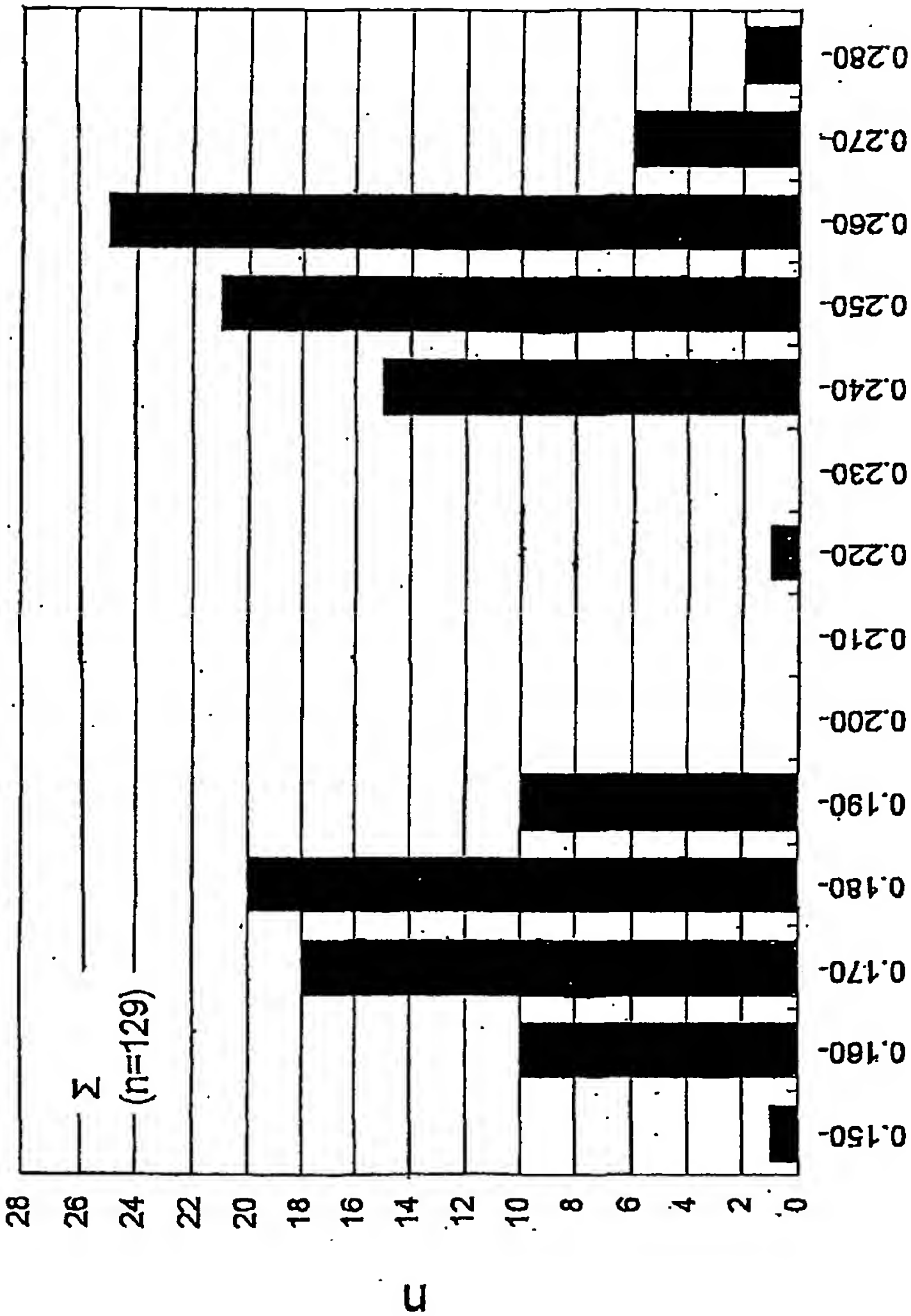
第 5 図



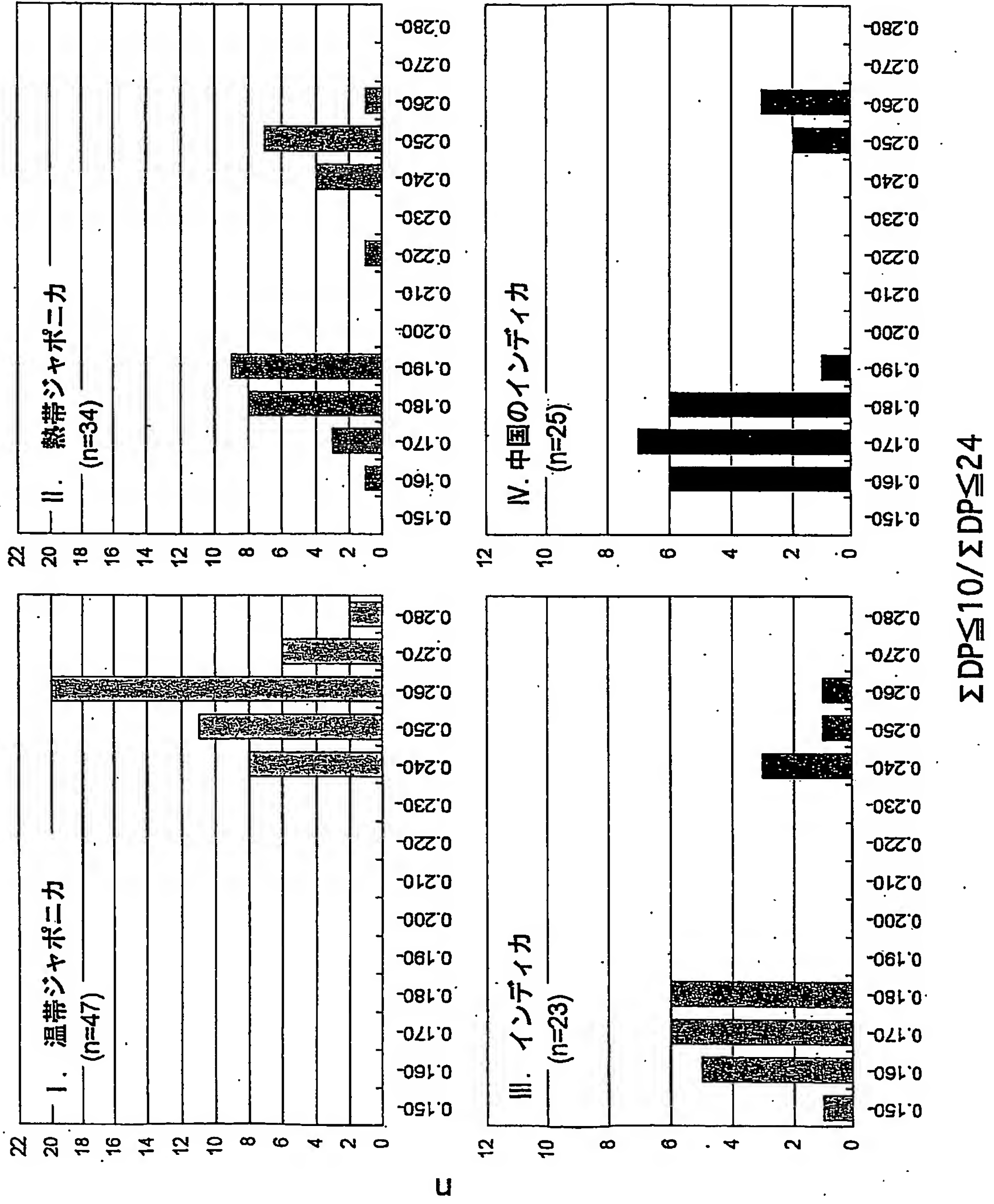
第 6 図



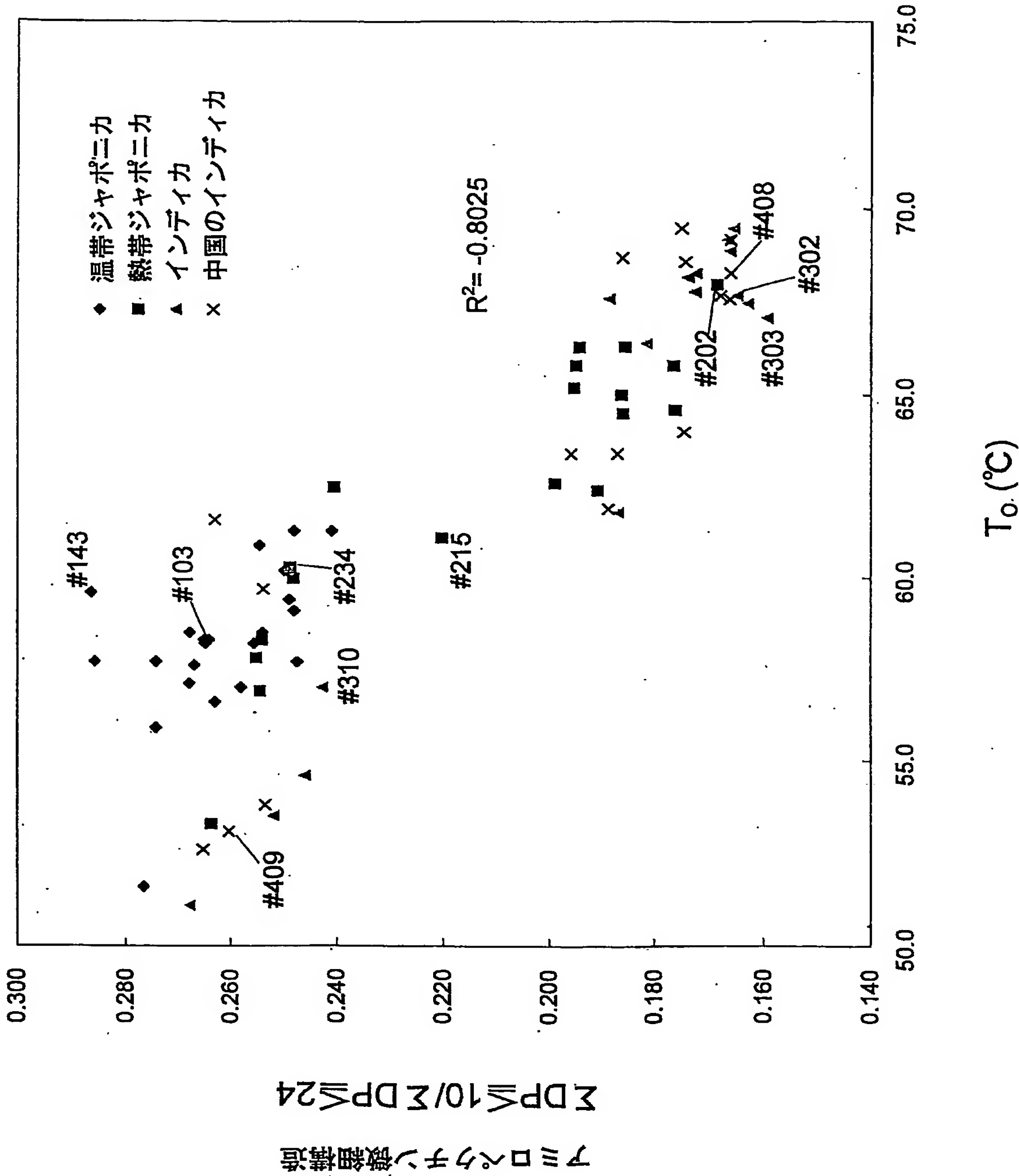
第 7 図



第 8 図



第 9 図



第 10 図

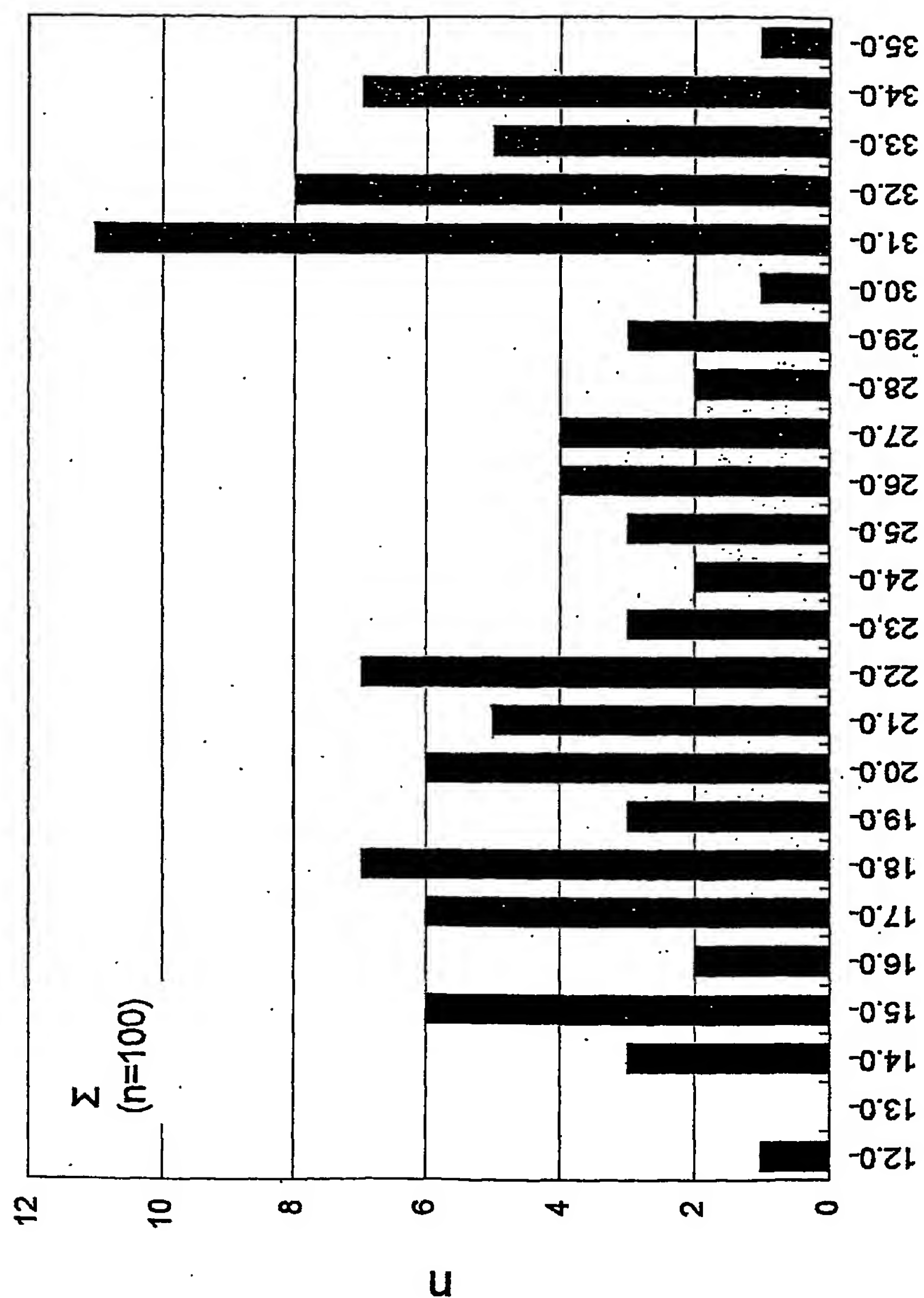
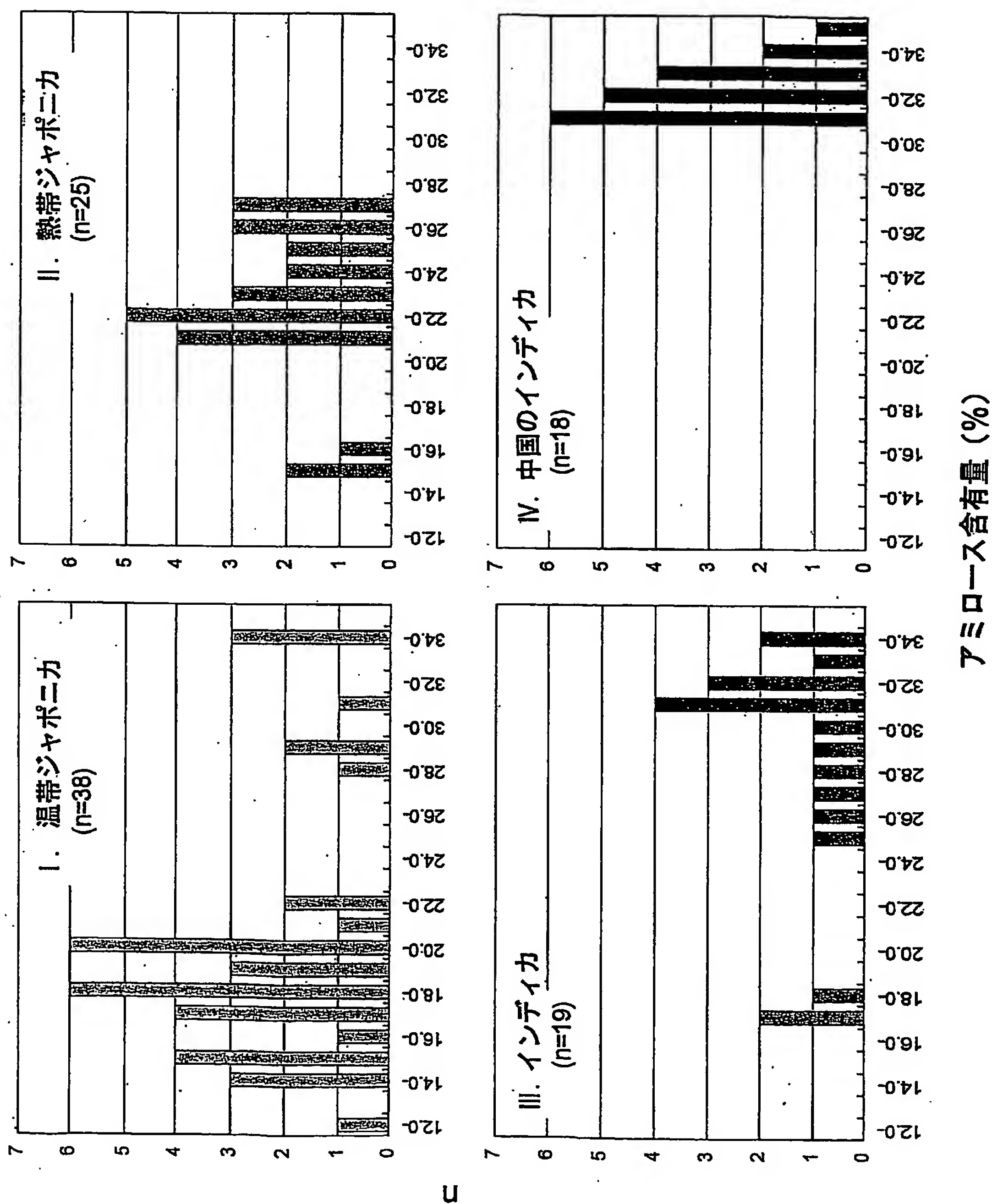
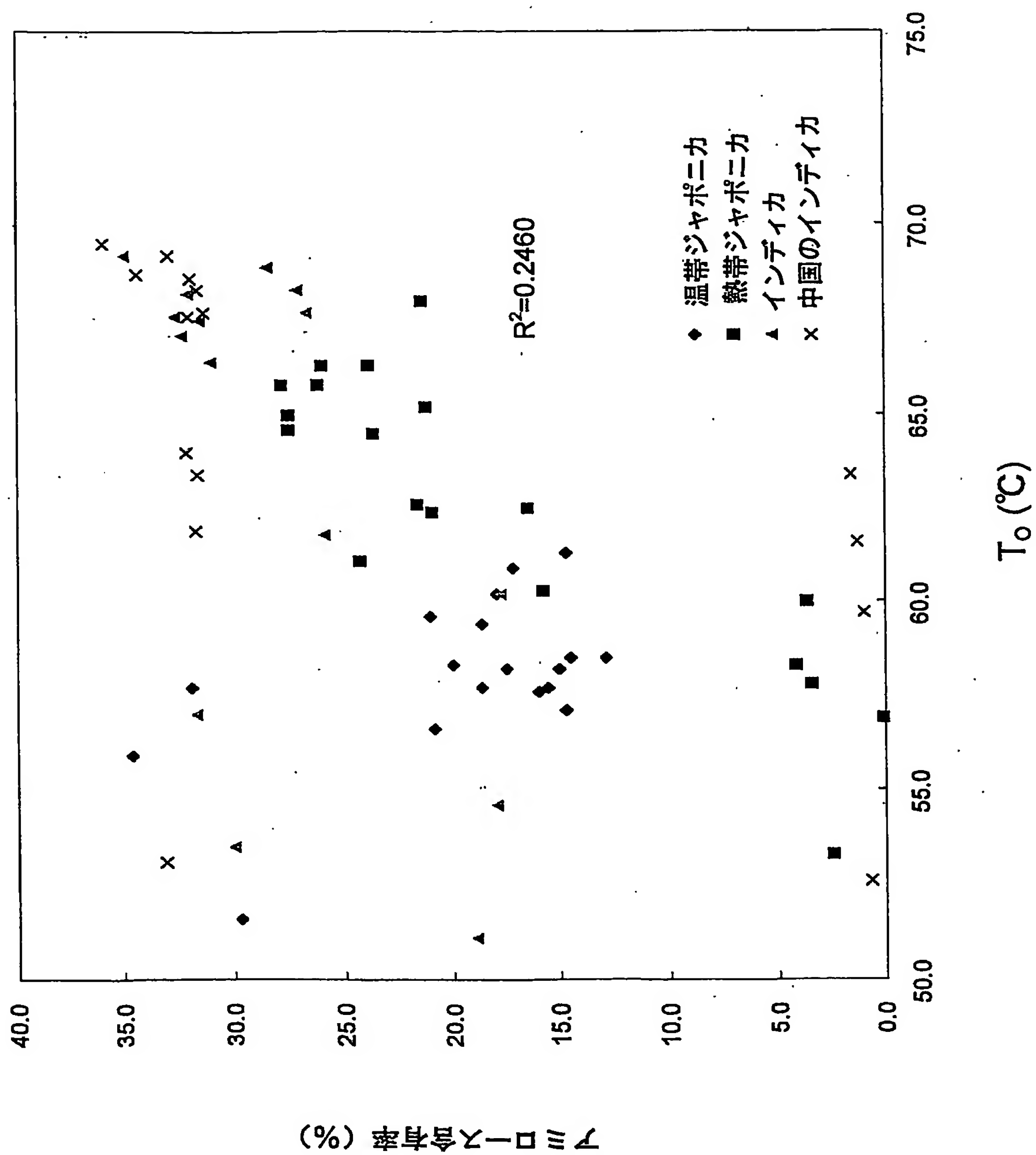


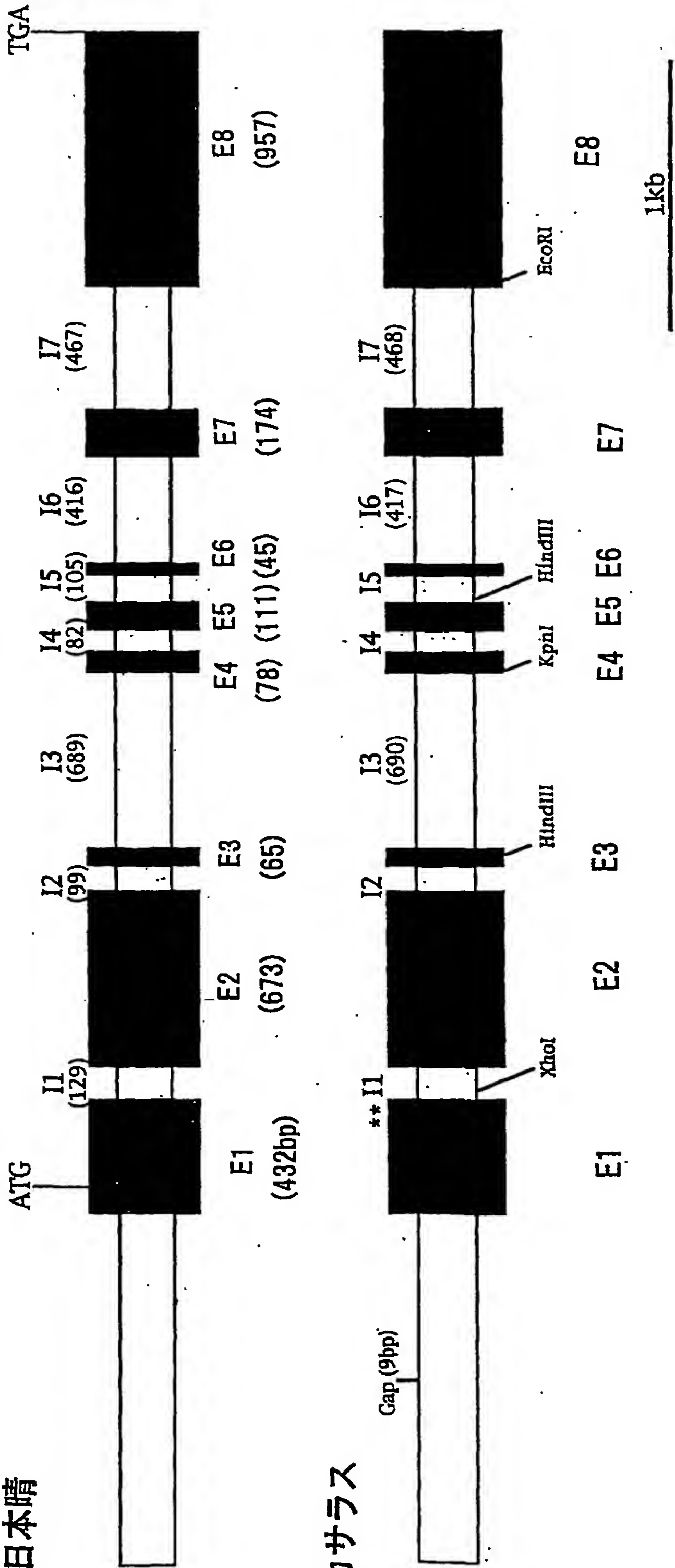
図 11 第 1



第 12 図



第 1 3 図



第 14 図

1' CTGCAGTTAGGAGTCCGATCGTCTCAAGTTAGCATGAGAGTTTTTTAAACAAATTTCTTATATGATTCTTTTGTATTACTAAAAGTG

1' CTGCAGTTAGGAGTCCGATCGTCTCAAGTTAGCATGAGAGTTTTTTAAACAAATTTCTTATATGATTCTTTTGTATTACTAAAAGTG

91' AACGATTTTAAACCGACTCAAATACGAATATGTAATTTCCGAAACCAAACGAACCTAAAACCTGACTCATACACGGATAACGTACCGAC

91' AACGATTTTAAACCGACTCAAATACGAATATGTAATTTCTGAAACCAAACGAACCTAAAACCTGACTCATACACGGATAACGTACCGAC

181' GTAAACATCTTCAATTTTATATAGCAGAGATATAGATTTCTTACACATTAGTCATCAGTCTACTATTGAATAATCAGATAAATCAAGT

181' GTAAACATCTTCAATTTTATATAGCAGAGATATAGATTTCTTACACATTAGTCATCAGTCTACTATTGAATAATCAGATAAATCAAGT

271' ATTTTAAGTAGGAACAAAAATTTTATGAAAATTCGTTGTAATAGTAGTACCATTTTGACCGTTCTGATTTTAGCCGTAAATAAAATTCG

271' ATTTTAAGTAGGAACAAAAATTTTATGAAAATTCGTTGTAATAGTAGTACCATTTTGACCGTTCTGATTTTAGCCGTAAATAAAATTCG

361' ATTTTCTTTCTAATCTTTTAGCACATAATACACCTACAGTAAATAGTTAAATTSGTAAATATATAAAAAATCCATTTTACTCACTTGA

361' ATTTTCTTTCTAATCTTTTAGCACATAATACAGCTACAGTAAATAGTTAAATTTGATAAATATATAAAAAATCCATTTTACTCACTTGA

451' ACTATTTTGATGAAGCGCTTAAACCCCTAAATAATTTTTCATCTGTTTTATACCCCCACCCCGAACTATFGAAAGTGGTTCCGCTTAT

451' ACTATTTTGATGAAGCGCTTAAACCCCTAAATAATTTTTCATCTGTTTTATACCCCCACCTCCGAACTATFGAAAGTGGTTCCGCTTAT

541' TTTCTAACAGCATTTCTTTTTTTATCTCTCTCGTATAAGTATATACGTTTGTTCGACTACCAATCTTCGTTGTAACTTTCTCAATAT

541' TTTCTAACAGCATTTCTTTTTTTATCTCTCTCGTATAAGTATATACGTTTGTTCGACTACCAATCTTAGTTGTAACTTTCTCAATAT

631' TCGTSCCGTGTATTATTACGCCAATACCGTAAACTAGCGACTATGGTTTGTGTGTGTGTGTATCATTTACCTAATTAGAGCTAGCTCTGCCA

631' TCGTGCCATGTATTATTACGCCAATACCGTAAACTAGCGACTATGGTTTGTGTGTGTGTGTATCATTTACC-----TAAGCTCTGCCA

721' CCACTGCCATTCTACCTGTATTTTAAACCTGCATCCGCACTGGCAGCCATCGCCTGACGGCTGGACTGGAGTCGTGAAGCGAACCGGA

712' CCACTGCCATTCTACCTGTATTTTAAACCT-CATCCGCACTGGCAGCCATCGCCTGACGGCTGGACTGGAGTCGTGAAGCGAACCGGA

811' TTTGTTCTCACGTGGATATGGTGCAGCGCTGCACACCGCGAAGCTTCCACTGGCAGGTGGTCCCCGGCTGTCAGCCAGTTCTACGGCCGT

801' TTTGTTCTCACGTGGATATGGTGCAGCGCTGCACACCGCGAAGCTTCCACTGGCAGGTGGTCCCCGGCTGTCAGCCAGTTCTACGGCCGT

901' CGAAGAAACGTTCCGAGGTTTGTGTTAGCACGCGGTTTCCGTTCTGTCGTTGGGGACGTGGGGGTTTGGCCCCACTTCCAAAACCACTA

891' CGAAGAAACGTTCCGAGGTTTGTGTTAGCACGCGGTTTCCGTTCTGTCGTTGGGGACGTGGGGGTTTGGCCCCACTTCCAAAACCACTA

991' TTCTTCCGCGCTGCACCCCGAGCCGTTAACGTCACCGACACGCGGGCCCCGCGAAACGGGTGACCCCGCATGGCAGACAAAGTAACCTCG

981' TTCTTCCGCGCTGCACCCCGAGCCGTTAACGTCACCGACACGCGGGCCCCGCGAAACGGGTGACCCCGCATGGCAGACAAAGTAACCTCG

1081' CTTCTGGAGAGGTGGGGCCCTCGGTGAGGTTCCCGTAGCGGACGACGGGGAGGGGAAGAGAAGAGAAGAAACGGCTACTCCTCCCCGCG

1071' CTTCTGGAGAGGTGGGGCCCTCGGTGAGGTTCCCGTAGCGGACGACGGGAAGGGGAAGAGAAGAGAAGAAACGGCTACTCCTCCCCGCG

1171' CGCCGGGCGCGGATGCGTTGGTTTGGGGTTTGGAGCGTTGCGGATGCGCACGGGCGACGCCACCGGTGGCGCACGCTTTACAGGTGGC

1161' CGCCGGGCGCGGCTGCGTTGGTTTGGGGTTTGGAGCGTTGCGGATGCGCACGGGCGACGCCACCGGTGGCGCACGCTTTACAGGTGGC

1261' TCCCCCGCCGCTCTCCCCCGCGCTGCCCTCCTCGCCCTCGCTCGCTGCCCATTTTCAATCCCCCGCACGGGCACGCGCGGGACGSAAGCAAA

1251' TCCCCCGCCGCTCTCCCCCGCGCTGCCCTCCTCGCCCTCGCTCGCTGCCCATTTTCAATCCCCCGCTCGGCACGCGCGGGAGGAAAGCAAA

1351' GCACGCGCACACACTCAAACCCGCGCCTCCTCCGCTCTCGCTCGCTGCCCATTTTCAATCCCCCGCTCGGCACGCGCGGGAGGTTCTCGGGGCG

1341' GCACGCGCACACACTCAAACCCGCGCCTCCTCCGCTCTCGCTCGCTGCCCATTTTCAATCCCCCGCTCGGCACGCGCGGGAGGTTCTCGGGGCG

1441' ACCATGTCGTCGGCCGTCGTCGCGTCATCCACCACGTTCTCTCGTCGCGCTCGCCTCTTCGCGCTCACGGGGAGGGCCAGGAGGGGGAGG

1431' ACCATGTCGTCGGCCGTCGTCGCGTCATCCACCACGTTCTCTCGTCGCGCTCGCCTCTTCGCGCTCACGGGGAGGGCCAGGAGGGGGAGG

1531' GTGGTGGGCGTGGCCGCGCCGCCGGCCCTGCTTTACGACGGCCGCGCCGGAAGGCTAGCCCTACGGGCGCCGCCCTCCGCCCGGCGCTCGG

1521' GTGGTGGGCGTGGCCGCGCCGCCGGCCCTGCTTTACGACGGCCGCGCCGGAAGGCTAGCCCTACGGGCGCCGCCCTCCGCCCGGCGCTCGG

1621' CCTCGGCGTCGGGATGCGGGCGTGGTGCGCCGCGGGATGATGGGGAGAAGCAGGCGGGCGGTGGAGCGGGCGGGTGAGGACGACGACGAG

1611' CCTCGGCGTCGGGATGCGGGCGTGGTGCGCCGCGGGATGATGGGGAGAAGCAGGCGGGCGGTGGAGCGGGCGGGTGAGGACGACGAGGAG

1711' GAGGAGGAGTTCTCTTCGGGCGCGTGGCAGCCGCCCGCTCGCGTCGCGCGGCGCTCGGCAAGTGGGTTGGTGGTGTCTGATCGGGGCGC

1701' GAGGAGGAGTTCTCTTCGGGCGCGTGGCAGCCGCCCGCTCGCGTCGCGCGGCGCTCGGCAAGTGGGTTGGTGGTGTCTGATCGGGGCGC

1801' CGAGATCGTCGTCGTCGAGAGGTGTTCTCTGCTTTGATTCGCTTTGATGTTTTCATTTGAAACCGACGCGTGTGCTTGCCTGCGCGCG

1791' CGAGATCGTCGTCGTCGAGAGGTGTTCTCTGCTTTGATTCGCTTTGATGTTTTCATTTGAAACCGACGCGTGTGCTTGCCTGCGCGCG

1891' CTGTGTTTGCAGGTCTTGAAGCGGAGGGGACCGTCCC GCCCGCTCGGCCGGTACGGCTCCGGCGGTGATGCGGCGAGAGTGCGCGGGGCG

1881' CTGTGTTTGCAGGTCTTGAAGCGGAGGGGACCGTCCC GCCCGCTCGGCCGGTACGGCTCCGGCGGTGATGCGGCGAGAGTGCGCGGGGCG

1981' GCCGCGCCGCGCGCCGGCGCCGACACAGGACGCCGCTCAAGTAAGAACGAGCGCTTCTCAGCGGCCGCGACGACGACACACCTGCCTCA

1971' GCCGCGCCGCGCGCCGGCGCCGACACAGGACGCCGCTCAAGTAAGAACGAGCGCTTCTCAGCGGCCGCGACGACGACACACCTGCCTCA

2071' CGGAACGGATCGGTCGTTACCGGGCGCCGACAAACCTGCGCGCCGACGCGCGCGGTGACCAATAAGAAAGCTCCAGCGCCGGACTCCCCC

2061' CGGAACGGATCGGTCGTTACCGGGCGCCGACAAACCTGCGCGCCGACGCGCGCGGTGACCAATAAGAAAGCTCCAGCGCCGGACTCCCCC

2161' GTGATCCTTCCATCCGTAGACAAGCCGCGAGCCGAGTTCTGTCATCCAGACGCGGACGCGCGCGCGCCGCGCCGCGCCGCGGTTCAAATCCC

2151' GTGATCCTTCCATCCGTAGACAAGCCGCGAGCCGAGTTCTGTCATCCAGACGCGGACGCGCGCGCGCGCGCCGCGCCGCGGTTCAAATCCC

2251' AGGTCTGTCGCTCCTCTCCCCAAGCCTGACAAATTCGGAATTTGCAGAGGATAAGAGCGCAAAAGTTGTTGAGAGTGCTCCGAAGCCAAAG

2241' AGGTCTGTCGCTCCTCTCCCCAAGCCTGACAAATTCGGAATTTGCAGAGGATAAGAGCGCAAAAGTTGTTGAGAGTGCTCCGAAGCCAAAG

2341' GCGACTAGATCTTCCCCATCTCTGCGGTAGAAGAGGAGACGTGGGATTTCAAGAAATATTTTGATCTGAACGAACCGGACGCCGCGGAG

2331' GCGACTAGATCTTCCCCATCTCTGCGGTAGAAGAGGAGACGTGGGATTTCAAGAAATATTTTGATCTGAACGAACCGGACGCCGCGGAG

2431' GATGGCGATGACGATGATGACTGGGCTGATTCAGATGCGTCAGATTCTGAGATCGACCAGGATGACGATTCGGGCCCTTTGGCTGGGGAG

2421' GATGGCGATGACGATGATGACTGGGCTGATTCAGATGCGTCAGATTCTGAGATCGACCAGGATGACGATTCGGGCCCTTTGGCTGGGGAG

2521' AATGTCATGAACGTGATCGTGGTGGCTGCTGAAATGTTCTCCCTGGTGCAAAAACAGSCATGTACACGATATATACCTCTTTTTTCTCTTTT

2511' AATGTCATGAACGTGATCGTGGTGGCTGCTGAAATGTTCTCCCTGGTGCAAAAACAGSCATGTACACGATATATACCTCTTTTTTCTCTTTT

2611' TTGTTCTTCTGATCTTGTAATAATTTGCTTCAGTTACTGATATGAACAAGTGTGCAATTTGCACAGGTGGGCTTGGAGATGTTGCAGGTGCT

2601' TTGTTCTTCTGATCTTGTAATAATTTGCTTCAGTTACTGATATGAACAAGTGTGCAATTTGCACAGGTGGGCTTGGAGATGTTGCAGGTGCT

2701' TTACCCAAAGCTTTGGCGAGGAGAGGACATCGTGTATGATATTAATCTCTCTTTTCTCTCTTCAATGTTGGATGTTTCTTCCATTCCTTA

2691' TTACCCAAAGCTTTGGCGAGGAGAGGACATCGTGTATGATATTAATCTCTCTTTTCTCTCTTCAATGTTGGATGTTTCTTCCATTCCTTA

2791' CAGATTGATCATTTAATTAACGTATATTTTCAGATATATAAATTTGGATCAAATGTAAAGCAGATTAGTTCTCTTATGTTCTTTTGTTT

2781' CAGATTGATCATTTAATTAACGTATATTTTCAGATATATAAATTTGGATCAAATGTAAAGCAGATTAGTTCTCTTATGTTCTTTTGTTT

2881' ACATAATCATGATGGCAAATTA AAAAAGGCTACTCCAGCTGTAGATTCAAATAACAAAAGTAATATTGATAAATTTGCAAACTCTGTA

2871' ACATAATCATGATGGCAAATTA AAAAAGGCTACTCCAGCTGTAGATTCAAATAACAAAAGTAATATTGATAAATTTGCAAACTCTGTA

2971' GAAAGCTAAATTTGCTTACTATTGTTACAGAAATGTTCAATTTCTAACATGCTGTTGAAAATATATACACATAGGCGTAGCCGCTTAGATCA

2961' GAAAGCTAAATTTGCTTACTATTGTTACAGAAATGTTCAATTTCTAACATGCTGTTGAAAATATATACACATAGGCGTAGCCGCTTAGATCA

3061' TCACGTGGCCATGGAACTAGTGCCAAAAGTAGTTCTCTTAGTTACACTAGTTACATACCTGTACATGATAACGGATCAGGCCCATACAA

3051' TCACGTGGCCATGGAACTAGTGCCAAAAGTAGTTCTCTTAGTTACACTAGTTACATACCTGTACATGATAACGGATCAGGCCCATACAA

3151' TTAGGGATAGATTAGGAGCCCGTTAACGAACTAGGCCCTTATAATTTAGGGAGGGACGGTAGTTACTTTTCGCATATGGACATGCTGCACG

3141' TTAGGGATAGATTAGGAGACCGTTAACGAACTAGGCCCTTATAATTTAGGGAGGGACGGTAGTTACTTTTCGCATATGGACACGCTGCACG

3241' TGTGGGAGGAGGGGATGGAAGGAAGACGACTTCGCTTTTAAAGATAGTAGAGAAATGTAGCAA-TTTTTTTTTAGCAATTTTAGTTATGGT

3231' CGTGGGAGGAGGGGATGGAAGGAAGACAACTTCGCTTTTAAAGATAGTAGAGAAATGTAGCAAATTTTTTTTTTAGCAATTTTAGTTATGGT

3330' AATAATATAAACCAACGTAATTCAGAGATCGGAAACGGGACTCTCGGTGACTTCCTGATATAAACTGATAACTGGCAAATGCATCTTT

3321' AATAATATAAACCAACGTAATTCAGAAATCGGAAACGGGACTCTCGGTGACTTCCTGATATAAACTGATAACTGGCAAATGCATCTTT

3420' CAATCTTAGGTTGTGGTACCAAGGTACGGTGATTACCGGAAGCCCAGGATGTAGGAATCAGGAAATACTACAAGGCTGCTGGACAGGTG

3411' CAATCTTAGGTTGTGGTACCAAGGTACGGTGATTACCGGAAGCCCAGGATGTAGGAATCAGGAAATACTACAAGGCTGCTGGACAGGTG

3510' TGTGTCAACAATGCAATCCAAGAAAGACTGGCATAGGAGACGCAAAATCCTTAGTAATTTGGTTTTATTTTGGGCTGCGAGTCTGGAAGT

3501' TGTGTCAACAATGCAATCCAAGAAAGACTGGCATAGGAGACGCAAAATCCTTAGTAATTTGGTTTTATTTTGGGCTGCGAGTCTGGAAGT

3600' GAAATATTTCCATGCATTTATCGATGGAGTTGATTTTGTGTTTATTGACGCTCCTCTCTTCCGTACCGTACAGGATGACATCTATGGGGG

3591' GAAATATTTCCATGCATTTATCGATGGAGTTGATTTTGTGTTTATTGACGCTCCTCTCTTCCGTACCGTACAGGATGACATCTATGGGGG

3690' GAACAGACAGTTGAAGCTTCTATCTGTTGGTATTACATTGCATTAGTAAAACTTAAAGTTGCATCTCCTAGGCGTACTGATTTGAAAATG

3681' GAACAGACAGTTGAAGCTTCTATCTGTTGGTATTACATTGCATTAGTAAAACTTAAAGTTGCATCTCCTAGGCGTACTGATTTGAAAATG

第 17 図

3780' CTTACCCATTCCTTTTCATTCAGGAAATCATGAAGCGCATGATTCCTGTTTGTAAAGGCTGCTGTTGAGGTATTTCTCCAACCTCCATT

3771' CTTACCCATTCCTTTTCATTCAGGAAATCATGAAGCGCATGATTCCTGTTTGTAAAGGCTGCTGTTGAGGTATTTCTCCAACCTCCATT

3870' ATCAATCATTAATTTGGTTTTAGGAATGAGATGTATTTGTTTGGTTTGAGGATGGTCAAAAAGCACAAATCATTTTTCTGTTGATAAAAT

3861' ATCAATCATTAATTTGGTTTTAGGAATGAGATGTATTTGTTTGGTTTGAGGAATGGTCAAAAAGCACAAATCATTTTTCTGTTGATAAAAT

3960' AGAAGAAGTGATTAACCTTTTGGACTGAAGCACACAATAAGTAGGAGAAATGAGGTCGCAGTA-GATGATTTGAATTTGATCCCTCAAAC

3951' AGAAGAAGTGATTAACCTTTTGGACTGAAGCACACAATAAGTAGGAGAAATGAGGTCGCAGTATGATGATTTGAATTTGATCCCTCAAAC

4049' AAACAGCCCGTAAATGTTTCTGCAAGATTTTCACAGAGATTCATATTCCTTTTTATTTTAAATATATTACACATTATCGCCAAATACACGG

4041' AAACAGCCCGTAAATGTTTCTGCAAGATTTTCACAGAGATTCATATTCCTTTTTATTTTAAATATATTACACATTATCGCCAAATACACGG

4139' ATGAACCTCTTCGATACCTCTAGCAGCATTTCAACCTGCTACCGTTCGTAATATGCAATGCTCTTGCCCAATGTTGTCATATGTTCCCTTA

4131' ATGAACCTCTTCGATACCTCTAGCAGCATTTCAACCTGCTACCGTTCGTAATATGCAATGCTCTTGCCCAATGTTGTCATATGTTCCCTTA

4229' CAAAGGGCTATATTTTCTGTTTCTGTACAATCGGCAGTTCCTTGGCAGCTTCCATGCGGTGGTGTGCCCTATGGGGATGGCAACTTGGT

4221' CAAAGGGCTATATTTTCTGTTTCTGTACAATCGGCAGTTCCTTGGCAGCTTCCATGCGGTGGTGTGCCCTATGGGGATGGCAACTTGGT

4319' GTTCCTTGCAACGATTTGGCACACTGCACCTCGCTGTTTATCTGAAGGCATATTACAGAGACAATGGCATGATGCAGTACACTCGCTC

4311' GTTCCTTGCAACGATTTGGCACACTGCACCTCGCTGTTTATCTGAAGGCATATTACAGAGACAATGGCATGATGCAGTACACTCGCTC

4409' TGTCTTGTGATACATAATATCGCTTACCAGSTTTTGTCTTCTCTCCCTCCCTAATGAATCATCTTTATTTCTATTTGTATGCATCTCCTG

4401' TGTCTTGTGATACATAATATCGCTTACCAGSTTTTGTCTTCTCTCCCTCCCTAATGAATCATCTTTATTTCTATTTGTATGCATCTCCTG

4499' CTGTTTGTAGAGAAATTAAGTTGAGTGCACAAATTTGTGGGTCAATGGTAATTAATGAGCAGGGACACGATAAACTCTTCTTCAGTCTATTA

4491' CTGTTTGTAGAGAAATTAAGTTGAGTGCACAAATTTGTGGGTCAATGGTAATTAATGAGCAGGGACACGATAAACTCTTCTTCAGTCTATTA

4589' CTACTTTTAGTTAGCAATTTCTCCGTTTCATATTAATAATTAAGTTCGTTTTTTTTCTAATCAAAACATCTTTACGTTTGATTAAGTTT

4581' CTACTTTTAGTTAGCAATTTCTCCGTTTCATATTAATAATTAAGTTCGTTTTTTTTCTAATCAAAACATCTTTACGTTTGATTAAGTTT

4679' ATCGAAAAATTTAACAGCATCTATAACATCAAAATTAAGTTTAAATTAATAATGTTTAAATGTAATTTGATTATATGTTTGTATTG
**
4671' ATAGAAAAATTTAACAGCATCTATAACATCAAAATTAAGTTTAAATTAATAATGTTTAAATGTAATTTGATTATATGTTTGTATTG

4769' GAAATGTTATTGTTATTTTCTATAACTAATTAATTTAAACTGTTTAACTTAAAAAAATATCAAAACAATTTACAATATGAAACGGGC

4761' GAAATGTTATTATATTTTCTATAACTAATTAATTTAAACTGTTTAACTTAAAAAAATATCAAAACAATTTACAATATGAAACGGTGC

4859' CGGGGAGTACTTTTTTGTG-TGCTAAATGTTTCGTGTAATGTTTGTAGGGCCGTGGCCAGTAGATGAATTCCTTACATGGAATTGCC

4851' CGGGGAGTACTTTTTTGTGATGCTAAATGTTTCGTGTAATGTTTGTAGGGCCGTGGCCAGTAGATGAATTCCTTACATGGAATTGCC

4948' GGAGCACTACCTGGATCACTTCAAGCTGTACGACCCCGTCGGCGGCGAGCACGCCAACATCTTCGGCGCGGGCCTGAAGATGGCGGACCG

4941' GGAGCACTACCTGGATCACTTCAAGCTGTACGACCCCGTCGGCGGCGAGCACGCCAACATCTTCGGCGCGGGCCTGAAGATGGCGGACCG

第 18 図

5038' GGTGGTGACCGTGAGCCCCGGCTACCTCTGGGAGCTGAAGACGACGGAGGGCGGGCTGGGGCTCCACGACATCATACGGGAGAACGACTG

5031' GGTGGTGACCGTGAGCCCCGGCTACCTCTGGGAGCTGAAGACGACGGAGGGCGGGCTGGGGCTCCACGACATCATACGGGAGAACGACTG

5128' GAAGATGAACGGCATCGTGAACGGCATCGACTACCGGGAGTGAACCCGGAGGTGGACGTGCACCTGCAGTCCGACGGCTACGCCAACTA

5121' GAAGATGAACGGCATCGTGAACGGCATCGACTACCGGGAGTGAACCCGGAGGTGGACGTGCACCTGCAGTCCGACGGCTACGCCAACTA

5218' CACCGTGGCCTCGCTGGACTCCAGCAAGCCGCGGTGCAAGGCGGCGCTGCAGCGCGAGCTGGGGCTGGAGGTGCGCGACGACGTGCCGCT

5211' CACCGTGGCCTCGCTGGACTCCGGCAAGCCGCGGTGCAAGGCGGCGCTGCAGCGCGAGCTGGGGCTGGAGGTGCGCGACGACGTGCCGCT

5308' GATCGGGTTCATCGGGCGGCTCGACGGGCAGAAAGGTGTGGACATCATCGGGCAGCGGATGCCGTGGATCGCCGGGCAGGACGTGCAGCT

5301' GATCGGGTTCATCGGGCGGCTCGACGGGCAGAAAGGGTGGACATCATCGGGCAGCGGATGCCGTGGATCGCCGGGCAGGACGTGCAGCT

5398' GGTGCTGCTGGGCTCCGGCCGCGCGACCTGGAGGTGATGCTGCAGCGGTTCGAGGCGCAGCACAACAGCAAGGTGCGCGGGTGGGTGGG

5391' GGTGCTGCTGGGCTCCGGCCGCGCGACCTGGAGGTGATGCTGCAGCGGTTCGAGGCGCAGCACAACAGCAAGGTGCGCGGGTGGGTGGG

5488' GTTCTCGGTGAAGATGGCGCACCGGATCACGGCGGGCGCCGACGTGCTGGTTCATGCCGTGCGGTTTCGAGCCGTGCGGCCCTCAACCAGCT

5481' GTTCTCGGTGAAGATGGCGCACCGGATCACGGCGGGCGCCGACGTGCTGGTTCATGCCGTGCGGTTTCGAGCCGTGCGGCCCTCAACCAGCT

5578' CTACGCCATGGCGTACGGCACCGTCCCCGTGCTGCACGCCGTGGCGGGCTGAGGGACACCATGTGCGGCGTTTCGACCCGTTTCGAGGACAC

5571' CTACGCCATGGCGTACGGCACCGTCCCCGTGCTGCACGCCGTGGCGGGCTGAGGGACACCATGTGCGGCGTTTCGACCCGTTTCGAGGACAC

5668' CGGCCTCGGGTGGACGTTTCGACCGCGCCGAGCCGCACAAGCTCATCGAGGCGCTCGGCCACTGCCTCGAGACGTACCGCAAGTACAAGGA

5661' CGGCCTCGGGTGGACGTTTCGACCGCGCCGAGCCGCACAAGCTCATCGAGGCGCTCGGCCACTGCCTCGAGACGTACCGCAAGTACAAGGA

5758' GAGCTGGAGGGGGCTCCAGGTGCGCGGCATGTGCGCAGGACCTCAGCTGGGACCACGCCGCCGAGCTCTACGAGGAGGTCTTGTCAAGGC

5751' GAGCTGGAGGGGGCTCCAGGTGCGCGGCATGTGCGCAGGACCTCAGCTGGGACCACGCCGCCGAGCTCTACGAGGAGGTCTTGTCAAGGC

5848' CAAGTACCAATGGTGAAGAGACCATGTCCGCCCCGGTCTCCGCTGCGCGTTCGGCAGCTATAGCTATAGCCTCCCTGAAGAAGCTT

5841' CAAGTACCAATGGTGAAGAGACCATGTCCGCCCCGGTCTCCGCTGCGCGTTCGGCAGCTATAGCTATAGCCTCCCTGAAGAAGCTT

第 19 図

1' GAAAGCAAAGCACGCGCACACACTCAAACCCGCGCCTCCTCCGCTCTCGTCCGTCGCTTCGGTTCGGTTCGGCTCGATCGGGAGGTTTC

1" GAAAGCAAAGCACGCGCACACACTCAAACCCGCGCCTCCTCCGCTCTCGTCCGTCGCTTCGGTTCGGTTCGGCTCGATCGGGAGGTTTC
91' CTCGGGGCGACCATGTCGTCGGCCGTCGTCGCGTCATCCACCACGTTCTCGTCGCGCTCGCCTCTTCGGCGTCACGGGGAGGGCCAGG

91" CTCGGGGCGACCATGTCGTCGGCCGTCGTCGCGTCATCCACCACGTTCTCGTCGCGCTCGCCTCTTCGGCGTCACGGGGAGGGCCAGG
181' AGGGGGAGGGTGGTGGGCGTGGCCGCGCCCGGCCCTGCTTTACGACGGCCGCGCCGGAAGGCTAGCCCTACGGGCGCCGCTCCGCCC

181" AGGGGGAGGGTGGTGGGCGTGGCCGCGCCCGGCCCTGCTTTACGACGGCCGCGCCGGAAGGCTAGCCCTACGGGCGCCGCTCCGCCC
271' CGGCCTCGGCCTCGGCGTCGGGATGCGGGCGTGGTGCGCCGCGCGGATGATGGGGAGAACGAGGCGGCGGTGGAGCGGGCGGGTGAGGAC

271" CGGCCTCGGCCTCGGCGTCGGGATGCGGGCGTGGTGCGCCGCGCGGATGATGGGGAGAACGAGGCGGCGGTGGAGCGGGCGGGTGAGGAC
361' GACGACGAGGAGGAGGAGTTCTCTTCGGGCGCGTGGCAGCCGCCCGCTCGCGTCGCGGCGGCGTCGGCAAGGTCTTGAAGCGGAGGGGC

361" GACGAGGAGGAGGAGGAGTTCTCTTCGGGCGCGTGGCAGCCGCCCGCTCGCGTCGCGGCGGCGTCGGCAAGGTCTTGAAGCGGAGGGGC
451' ACCGTCCCGCCCGTCGGCCGGTACGGCTCCGGCGGTGATGCGGCGAGAGTGC CGGGGCGGCCGCGCCGCGCCGCGCCGACACAGGAC

451" ACCGTCCCGCCCGTCGGCCGGTACGGCTCCGGCGGTGATGCGGCGAGAGTGC CGGGGCGGCCGCGCCGCGCCGCGCCGCGCCGACACAGGAC
541' GCCGCTCAAGTAAGAACGGAGCGCTTCTCAGCGGCCGCGACGACGACACCTGCCTCACGGAACGGATCGGTGCTTACGGCGCCGAC

541" GCCGCTCAAGTAAGAACGGAGCGCTTCTCAGCGGCCGCGACGACGACACCTGCCTCACGGAACGGATCGGTGCTTACGGCGCCGAC
631' AAGCCTGCCGCCGCCACGCCGCCGTGACCATAACGAAGCTCCAGCGCCGGACTCCCCGTGATCCTTCCATCCGTAGACAAGCCGCGAG

631" AAGCCTGCCGCCGCCACGCCGCCGTGACCATAACGAAGCTCCAGCGCCGGACTCCCCGTGATCCTTCCATCCGTAGACAAGCCGCGAG
721' CCGGAGTTCGTATCCAGACGCGACGGCGCCGGCGCCGCCACCGCCCGGTTCAAATCCCAGGTCTCGTCCGCTCCTCTCCCAAGCCTGAC

721" CCGGAGTTCGTATCCAGACGCGACGGCGCCGGCGCCGCCACCGCCCGGTTCAAATCCCAGGTCTCGTCCGCTCCTCTCCCAAGCCTGAC
811' AATTCGGAATTTGCAGAGGATAAGAGCGCAAAAGTTGTTGAGAGTGCTCCGAAGCCAAAGGCGACTAGATCTTCCCTATTCCTGCGGTA

811" AATTCGGAATTTGCAGAGGATAAGAGCGCAAAAGTTGTTGAGAGTGCTCCGAAGCCAAAGGCGACTAGATCTTCCCTATTCCTGCGGTA
901' GAAGAGGAGACGTGGGATTTCAAGAAATATTTTGATCTGAACGAACCGGACGCCGCGGAGGATGGCGATGACGATGATGACTGGGCTGAT

901" GAAGAGGAGACGTGGGATTTCAAGAAATATTTTGATCTGAACGAACCGGACGCCGCGGAGGATGGCGATGACGATGATGACTGGGCTGAT
991' TCAGATGCGTCAGATTCGTGAGATCGACCAGGATGACGATTCGGGCCCTTTGGCTGGGGAGAAATGTCATGAACGTGATCGTGGTGGCTGCT

991" TCAGATGCGTCAGATTCGTGAGATCGACCAGGATGACGATTCGGGCCCTTTGGCTGGGGAGAAATGTCATGAACGTGATCGTGGTGGCTGCT
1081' GAATGTTCTCCCTGGTGCAAAACAGGTGGGCTTGGAGATGTTGCAGGTGCTTTACCCAAAGCTTTGGCGAGGAGAGGACATCGTGTATG

1081" GAATGTTCTCCCTGGTGCAAAACAGGTGGGCTTGGAGATGTTGCAGGTGCTTTACCCAAAGCTTTGGCGAGGAGAGGACATCGTGTATG
1171' GTTGTGGTACCAAGGTACGGTGATTACGCGGAAGCCAGGATGTGGGAATCAGGAAATACTACAAGGCTGCTGGACAGGATCTGGAAGTG

1171" GTTGTGGTACCAAGGTACGGTGATTACGCGGAAGCCAGGATGTGGGAATCAGGAAATACTACAAGGCTGCTGGACAGGATCTGGAAGTG

第 20 図

1261' AAATATTTCATGCAATTTATCGATGGAGTTGATTTTGTGTTTCATTGACGCTCCTCTCTCCGTCACCGTCAGGATGACATCTATGGGGGG

1261" AAATATTTCATGCAATTTATCGATGGAGTTGATTTTGTGTTTCATTGACGCTCCTCTCTCCGTCACCGTCAGGATGACATCTATGGGGGG

1351' AACAGACAGGAAATCATGAAGCGCATGATTCTGTTTGTAAAGGCTGCTGTTGAGGTTCCCTGGCACGTTCCATGCGGTGGTGTGCCCTAT

1351" AACAGACAGGAAATCATGAAGCGCATGATTCTGTTTGTAAAGGCTGCTGTTGAGGTTCCCTGGCACGTTCCATGCGGTGGTGTGCCCTAT

1441' GGGGATGGCAACTTGGTGTTCCTTGCAAAACGATTGGCACACTGCCTCCTGCTTATCTGAAGGCATATTACAGAGACAAATGGCATG

1441" GGGGATGGCAACTTGGTGTTCCTTGCAAAACGATTGGCACACTGCCTCCTGCTTATCTGAAGGCATATTACAGAGACAAATGGCATG

1531' ATGCAGTACACTCGCTCTGCTCTGTGATACTAATAATCGCTTACCAGGGCCGTGGCCCCAGTAGATGAATTCCCCTACATGGAATTGCCG

1531" ATGCAGTACACTCGCTCTGCTCTGTGATACTAATAATCGCTTACCAGGGCCGTGGCCCCAGTAGATGAATTCCCCTACATGGAATTGCCG

1621' GAGCACTACCTGGATCACTTCAAGCTGTACGACCCCGTCGGCGGCGAGCACGCCAACATCTTCGGCGCGGGCCTGAAGATGGCGGACCGG

1621" GAGCACTACCTGGATCACTTCAAGCTGTACGACCCCGTCGGCGGCGAGCACGCCAACATCTTCGGCGCGGGCCTGAAGATGGCGGACCGG

1711' GTGGTGACCGTGAGCCCCGGCTACCTCTGGGAGCTGAAGACGACGGAGGGCGGCTGGGGCCTCCACGACATCATACGGGAGAACGACTGG

1711" GTGGTGACCGTGAGCCCCGGCTACCTCTGGGAGCTGAAGACGACGGAGGGCGGCTGGGGCCTCCACGACATCATACGGGAGAACGACTGG

1801' AAGATGAACGGCATCGTGAACGGCATCGACTACCGGGAGTGAACCCGGAGGTGGACGTGCACCTGCAGTCCGACGGCTACGCCAACTAC

1801" AAGATGAACGGCATCGTGAACGGCATCGACTACCGGGAGTGAACCCGGAGGTGGACGTGCACCTGCAGTCCGACGGCTACGCCAACTAC

1891' ACCGTGGCCTCGCTGGACTCCAGCAAGCCGCGGTGCAAGGCGGCGCTGCAGCGCGAGCTGGGGCTGGAGGTGCGCGACGACGTGCCGCTG

1891" ACCGTGGCCTCGCTGGACTCCAGCAAGCCGCGGTGCAAGGCGGCGCTGCAGCGCGAGCTGGGGCTGGAGGTGCGCGACGACGTGCCGCTG

1981' ATCGGGTTCATCGGGCGGCTCGACGGGCAGAAAGGGTGTGGACATCATCGGCGACGCGATGCCGTGGATCGCCGGGCAGGACGTGCAGCTG

1981" ATCGGGTTCATCGGGCGGCTCGACGGGCAGAAAGGGTGTGGACATCATCGGCGACGCGATGCCGTGGATCGCCGGGCAGGACGTGCAGCTG

2071' GTGCTGCTGGGCTCCGGCCGCCGACCTGGAGGTGATGCTGCAGCGGTTCCAGGCGCAGCACAACAGCAAGGTGCGCGGGTGGGTGGGG

2071" GTGCTGCTGGGCTCCGGCCGCCGACCTGGAGGTGATGCTGCAGCGGTTCCAGGCGCAGCACAACAGCAAGGTGCGCGGGTGGGTGGGG

2161' TTCTCGGTGAAGATGGCGCACCGGATCAGGGCGGGCGCCGACGTGCTGGTTCATGCCGTGCGGTTCCAGCCGTGCGGCCTCAACCAGCTC

2161" TTCTCGGTGAAGATGGCGCACCGGATCAGGGCGGGCGCCGACGTGCTGGTTCATGCCGTGCGGTTCCAGCCGTGCGGCCTCAACCAGCTC

2251' TACGCCATGGCGTACGGCACCGTCCCCGTGCTGCACGCCGTGGCGGGCTGAGGGACACCATGTCGGCGTTTCGACCCGTTTCGAGGACACC

2251" TACGCCATGGCGTACGGCACCGTCCCCGTGCTGCACGCCGTGGCGGGCTGAGGGACACCATGTCGGCGTTTCGACCCGTTTCGAGGACACC

2341' GGCCCTCGGGTGGACGTTTCGACCGCGCCGAGCCGACAAAGCTCATCGAGGCGCTCGGCCACTGCCCTCGAGACGTACCGCAAGTACAAGGAG

2341" GGCCCTCGGGTGGACGTTTCGACCGCGCCGAGCCGACAAAGCTCATCGAGGCGCTCGGCCACTGCCCTCGAGACGTACCGCAAGTACAAGGAG

2431' AGCTGGAGGGGGCTCCAGGTGCGCGGCATGTCGCAGGACCTCAGCTGGGACCACGCCGCGAGCTCTACGAGGAGGTCTTGTCAAGGCC

2431" AGCTGGAGGGGGCTCCAGGTGCGCGGCATGTCGCAGGACCTCAGCTGGGACCACGCCGCGAGCTCTACGAGGAGGTCTTGTCAAGGCC

2521' AAGTACCAATGGTGAAGAGACCATGTCCGCCCCGGGTCTCCGCTGCGCGTTCCGGCAGCTATAGCTATAGCCTCCCTGAAGAAGCTT

2521" AAGTACCAATGGTGAAGAGACCATGTCCGCCCCGGGTCTCCGCTGCGCGTTCCGGCAGCTATAGCTATAGCCTCCCTGAAGAAGCTT

第 2 1 図

1' MSSAVVASSTTFLVALASSASRGGPRRGRVVGVAAPPALLYDGRAGRLALRAPPPrPRPRRRDAGVVRADDGENEAAVERAGEDDDEE

 1" MSSAVVASSTTFLVALASSASRGGPRRGRVVGVAAPPALLYDGRAGRLALRAPPPrPRPRRRDAGVVRADDGENEAAVERAGEDDDEE

91' EEFSSGAWQPPRSRRGGVGKVLKRRGTVPVGRYSGGDAARVRGAAAPAPAPTQDAASSKNGALLSGRDDDTPASRNGSVVTGADKPAA

 91" EEFSSGAWHPPRSRRGGVGKVLKRRGTVPVGRYSGGDAARVRGAAAPAPAPTQDAASSKNGALLSGRDDDTPASRNGSVVTGADKPAA

181' ATPPVTTITKLPA DSPVILPSVDKPQPEFVIPDATA PAPPPrPGSNPRSSAPLPKPDNSEFAEDKSAKVVE SAPKPKATRSSPIPAVEEET

 181" ATPPVTTITKLPA DSPVILPSVDKPQPEFVIPDATA PAPPPrPGSNPRSSAPLPKPDNSEFAEDKSAKVVE SAPKPKATRSSPIPAVEEET

271' WDFKKYFDLNEPDAAEDGDDDDWADSDASDSEIDQDDSGPLAGENVNMNIVVAAECSPWCKTGGLGDVAGALPKALARRGHRVMVVVP

 271" WDFKKYFDLNEPDAAEDGDDDDWADSDASDSEIDQDDSGPLAGENVNMNIVVAAECSPWCKTGGLGDVAGALPKALARRGHRVMVVVP

361' RYGDYAEAQDVGIRKYYKAAGQDLEVKYFHAFIDGVDVFVIDAPLFRHRQDDIYGGNRQEIIMKRMILFCKAAVEVPWHVPCGGVPYGDGN

 361" RYGDYAEAQDVGIRKYYKAAGQDLEVKYFHAFIDGVDVFVIDAPLFRHRQDDIYGGNRQEIIMKRMILFCKAAVEVPWHVPCGGVPYGDGN

451' LVFLANDWHTALLPVYLKAYYRDNGMMQYTRSVLVIHNIAYQGRGPVDEFPYMELEPHYLDHFKLYDPVGGEHANIFGAGLKMADRVTTV

 451" LVFLANDWHTALLPVYLKAYYRDNGMMQYTRSVLVIHNIAYQGRGPVDEFPYMELEPHYLDHFKLYDPVGGEHANIFGAGLKMADRVTTV

541' SPGYLWELKTTEGGWGLHDIIRENDWKMGIVNGIDYREWNFEVDVHLQSDGYANYTVA SLDSKPRCKAALQRELGLEVRDDVPLIGFI

 541" SPGYLWELKTTEGGWGLHDIIRENDWKMGIVNGIDYREWNFEVDVHLQSDGYANYTVA SLDSKPRCKAALQRELGLEVRDDVPLIGFI

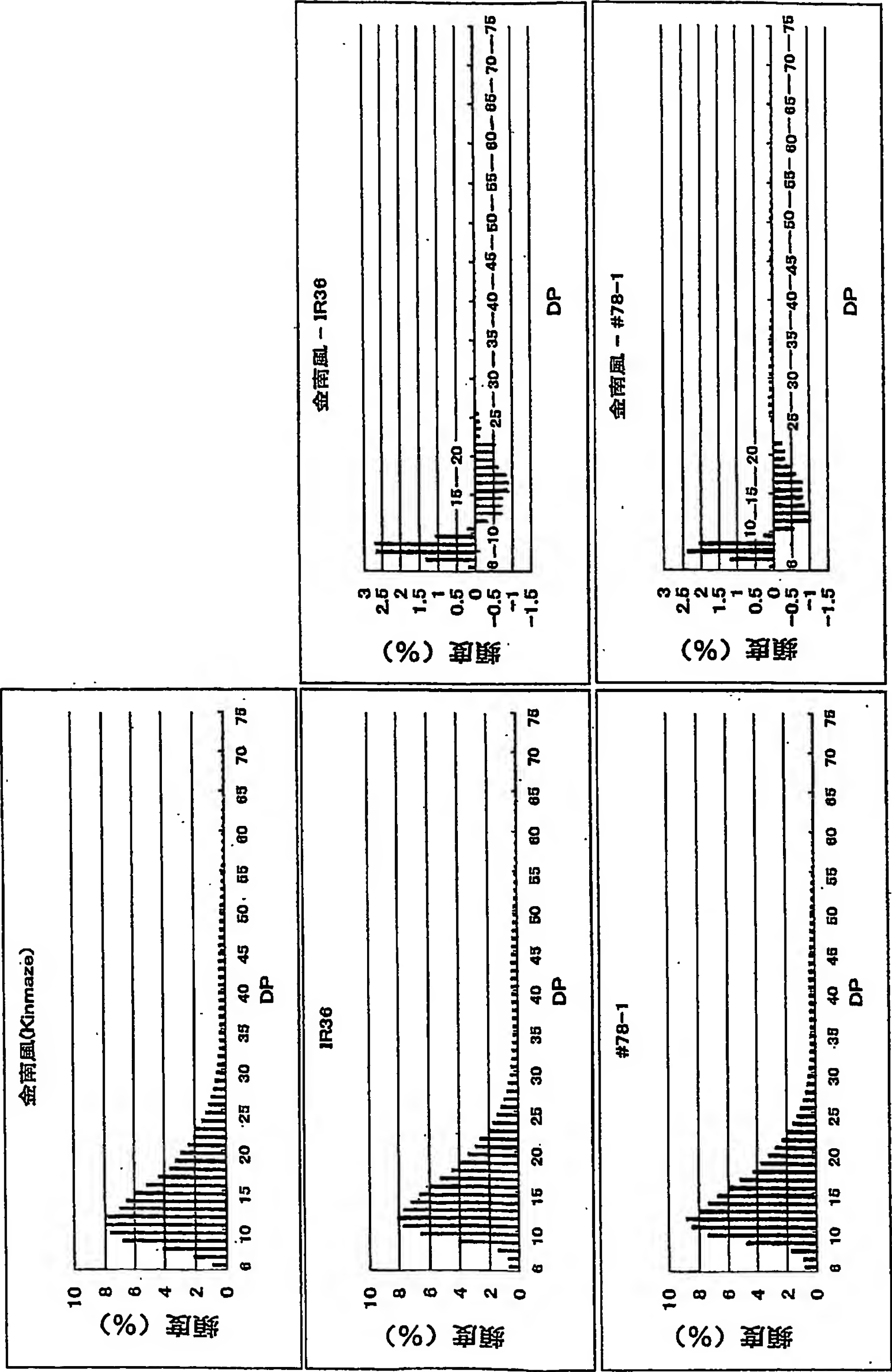
631' GRLDGQKGVDIIGDAMPWIAGQDVQLVLLGSGRRDLEVMLQRFQAQHN SKVRGWVGF SVKMAHRITAGADVLMPSRFEPCGLNQLYAMA

 631" GRLDGQKGVDIIGDAMPWIAGQDVQLVLLGSGRRDLEVMLQRFQAQHN SKVRGWVGF SVKMAHRITAGADVLMPSRFEPCGLNQLYAMA

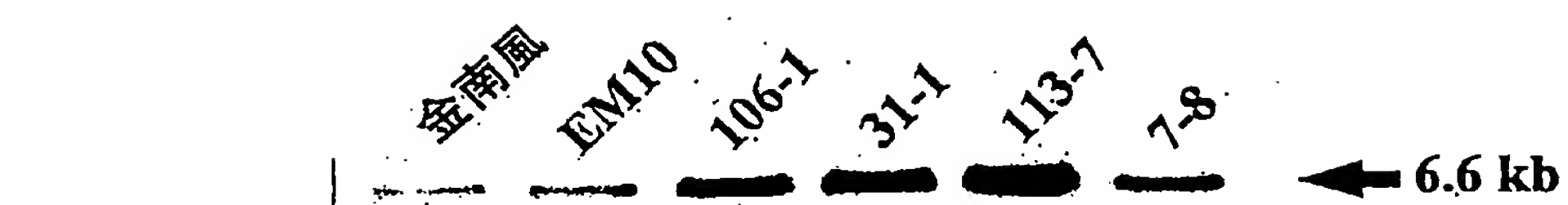
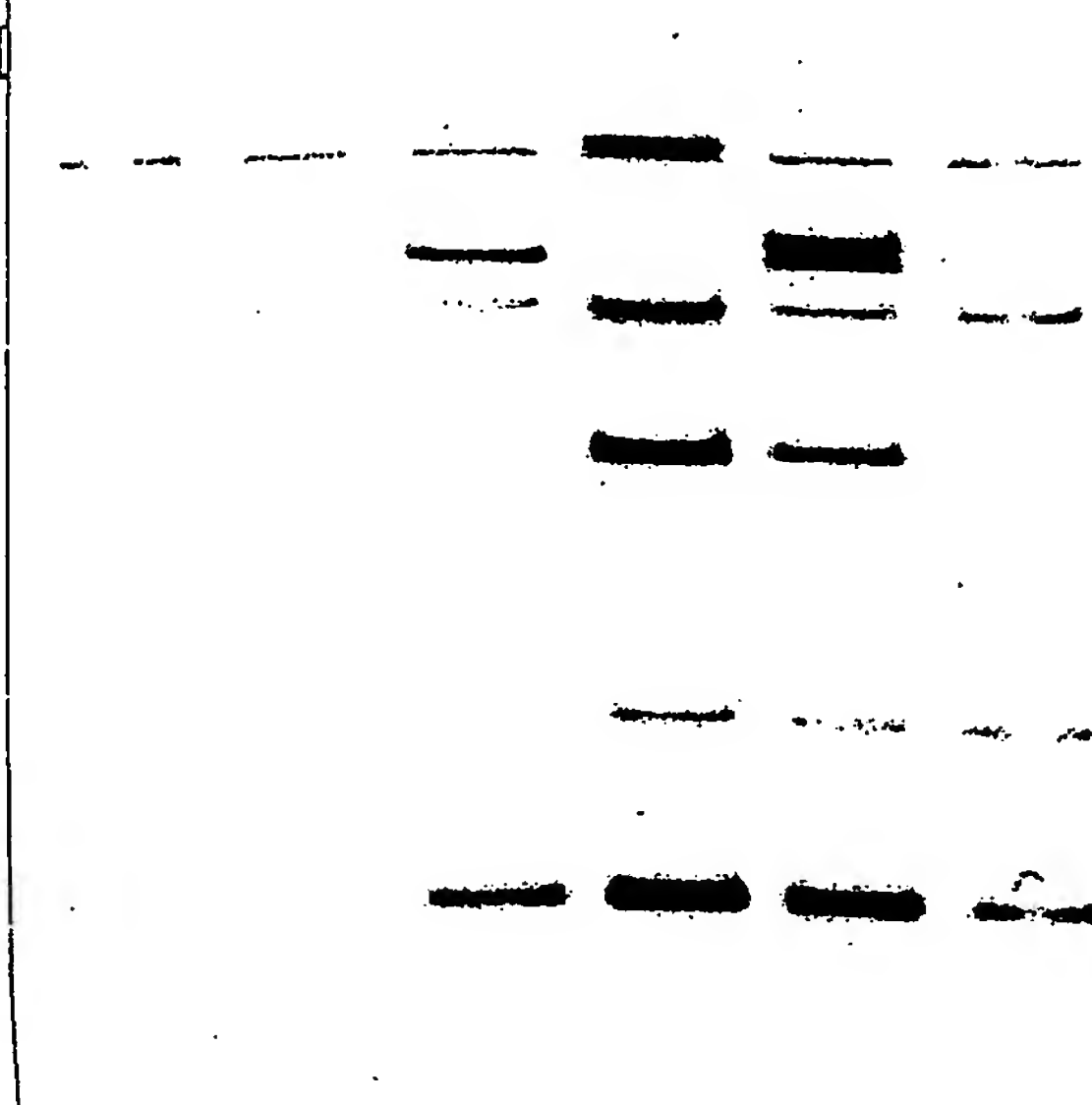
721' YGTVPVVHAVGGLRDTMSAFDPFEDTGLGWTFDRAEPKLIKALGHCLTYRKYKESWRGLQVRGMSQDLSWDHAAELYEEVLVKAKYQW

 721" YGTVPVVHAVGGLRDTVSAFDPFEDTGLGWTFDRAEPKLIKALGHCLTYRKYKESWRGLQVRGMSQDLSWDHAAELYEEVLVKAKYQW

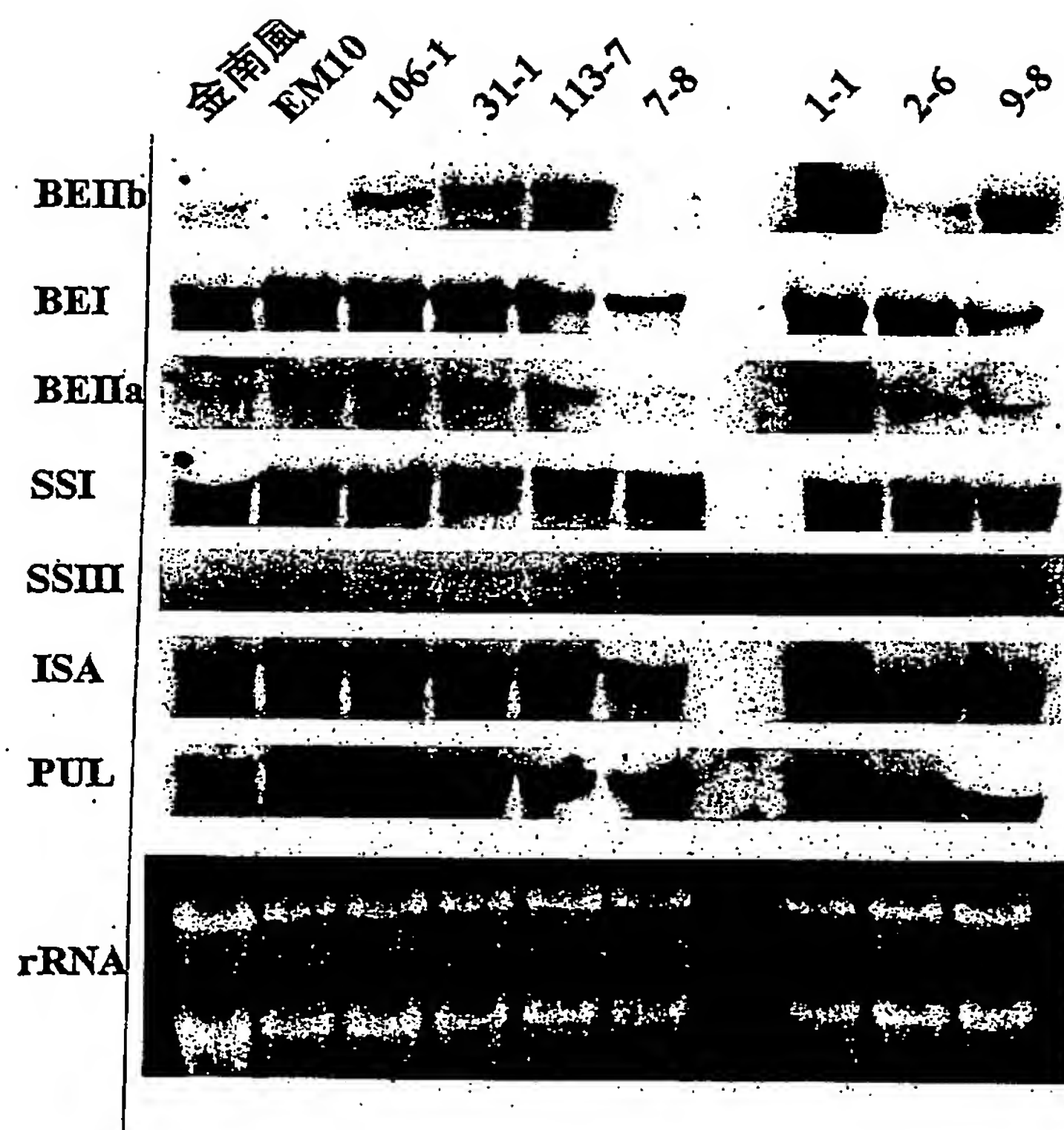
第 2 2 図



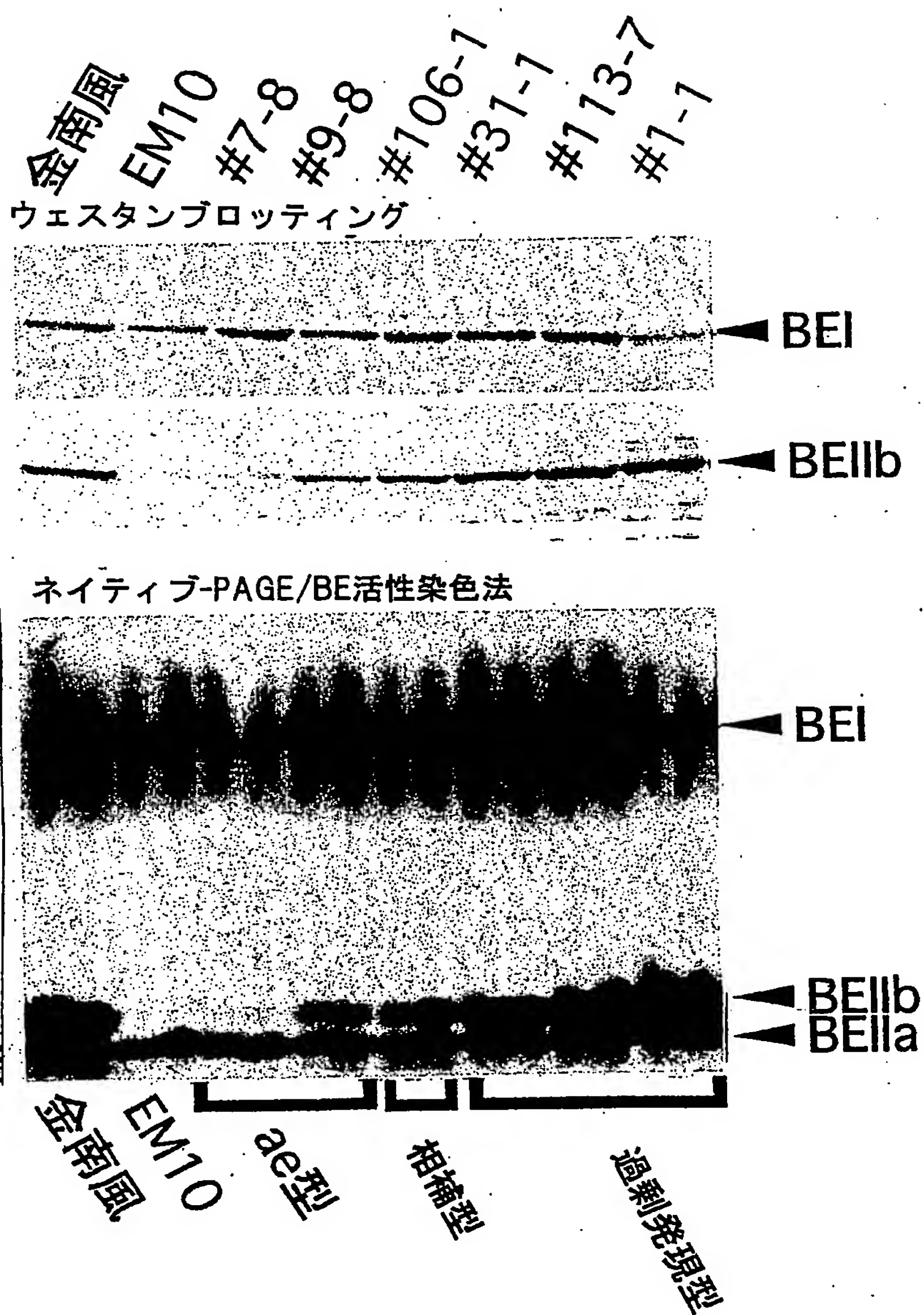
第 23 図

a) *Bam*HIb) *Hind*III

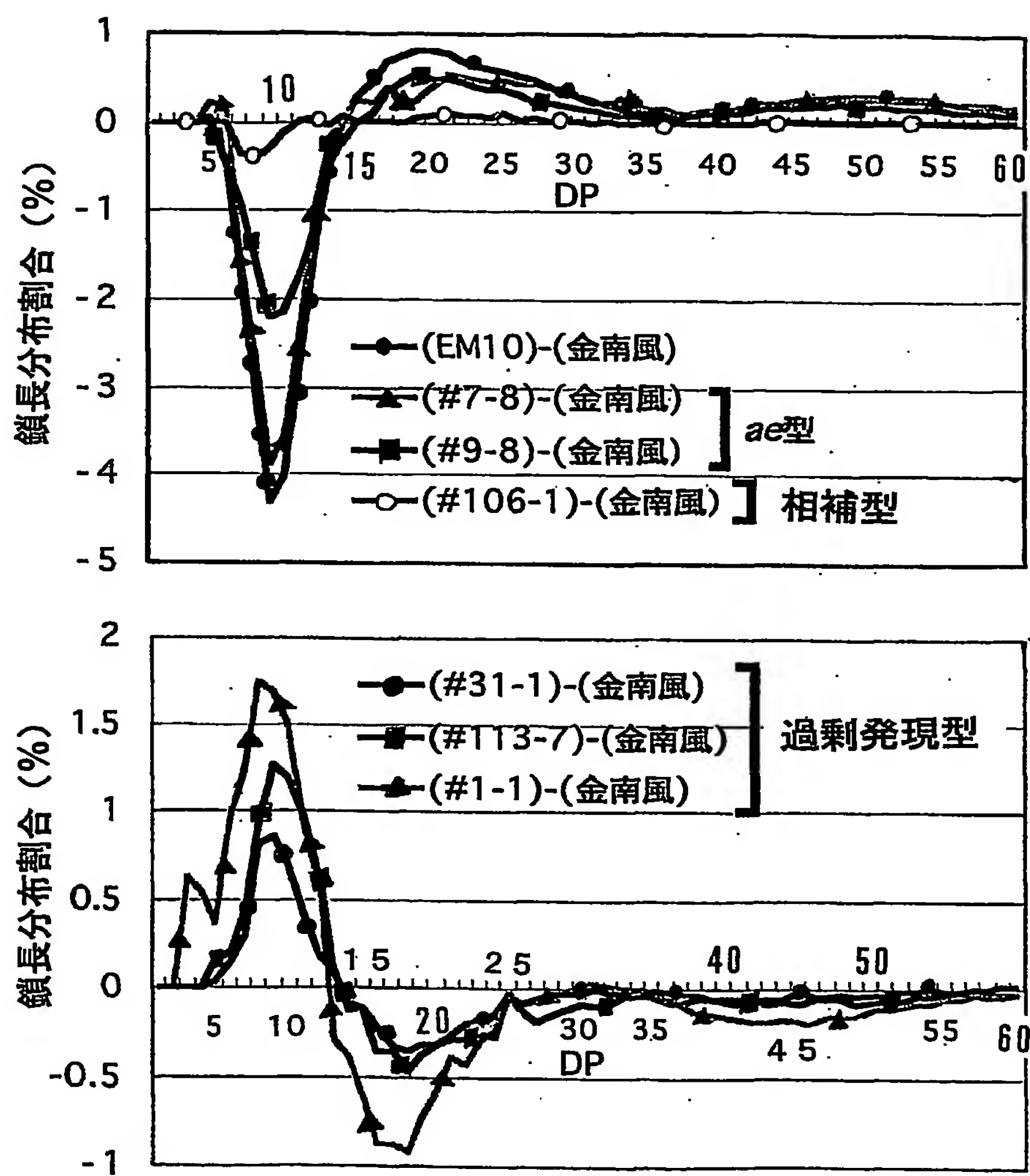
第 24 図



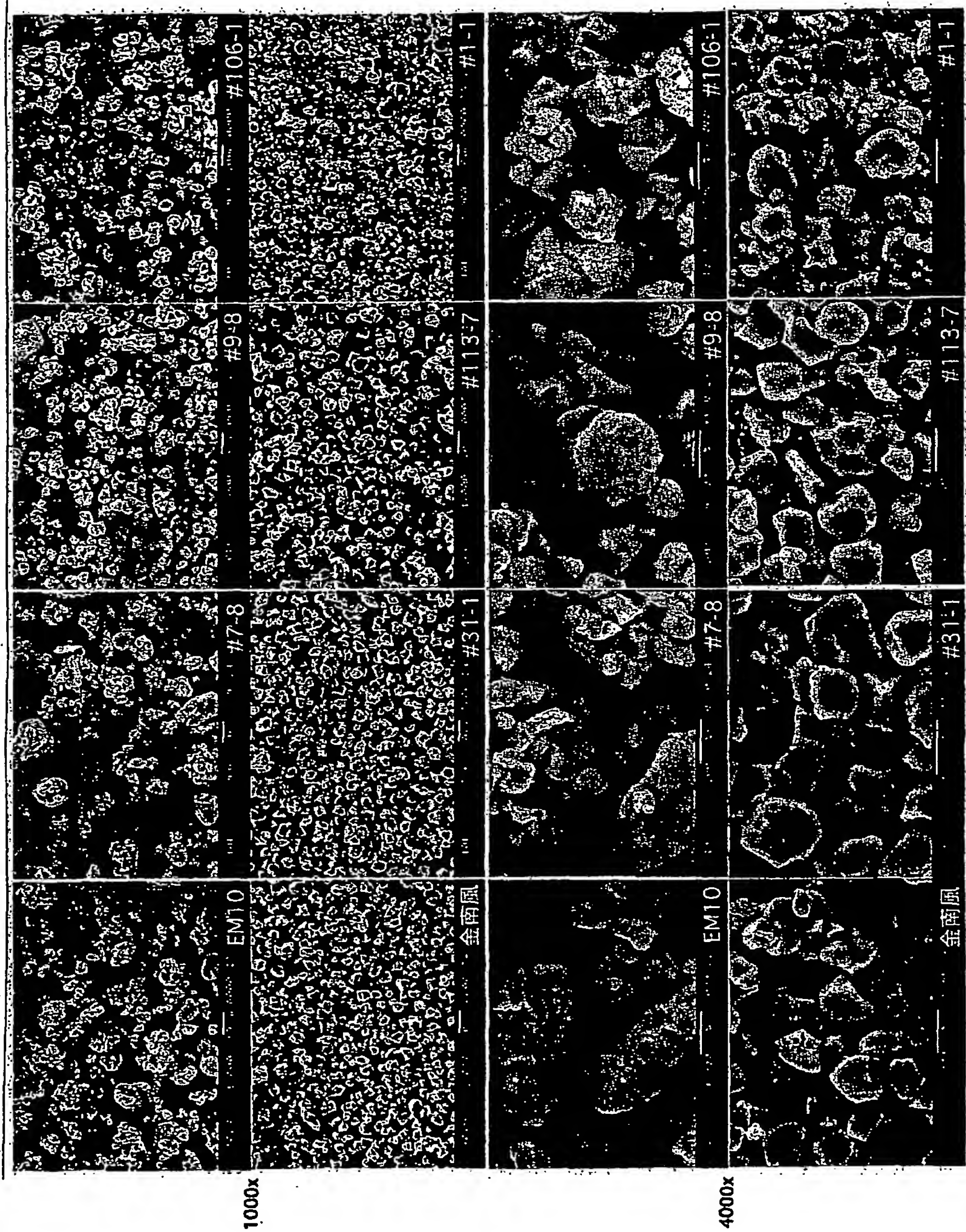
第 25 図



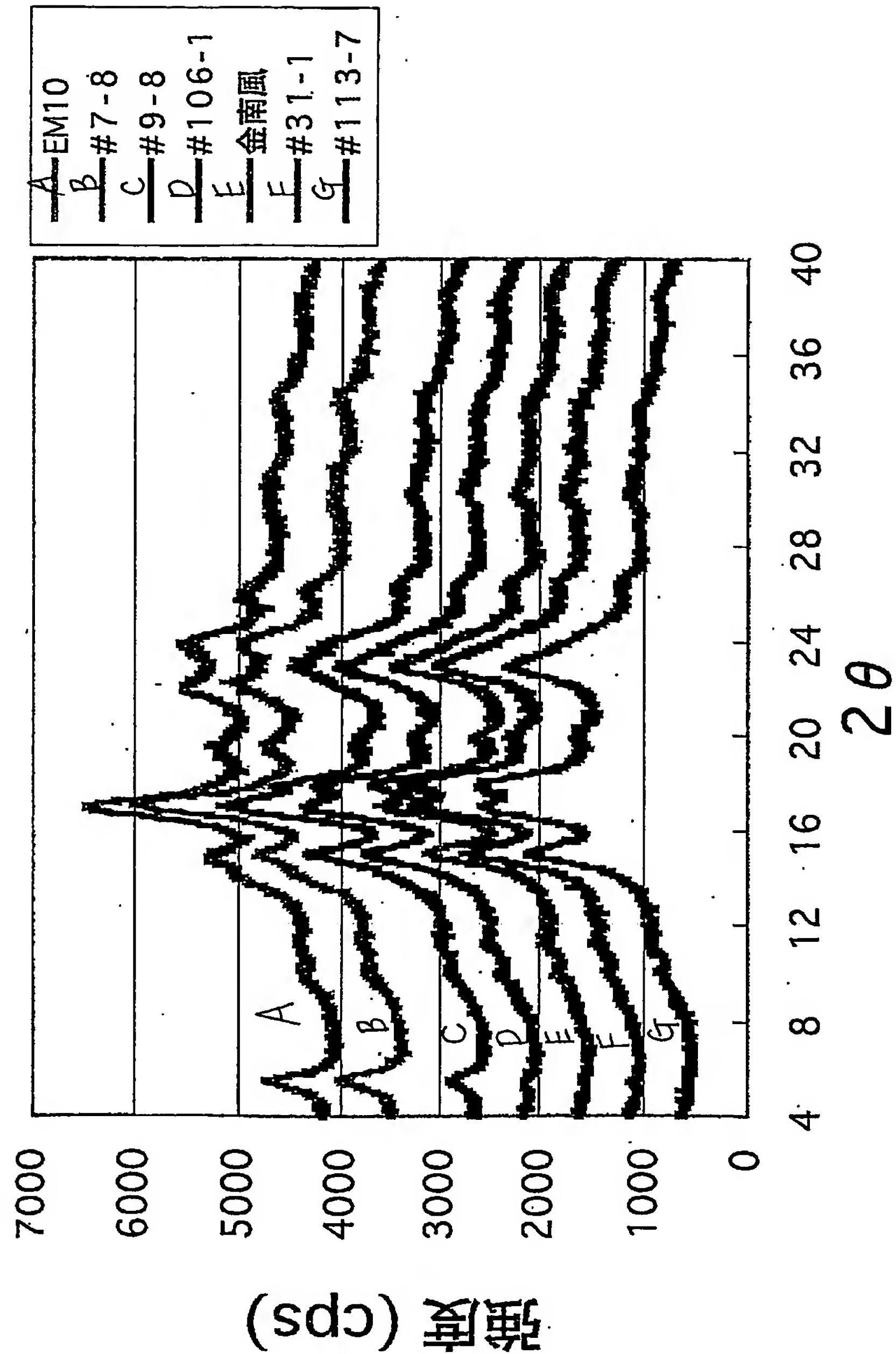
第 26 図



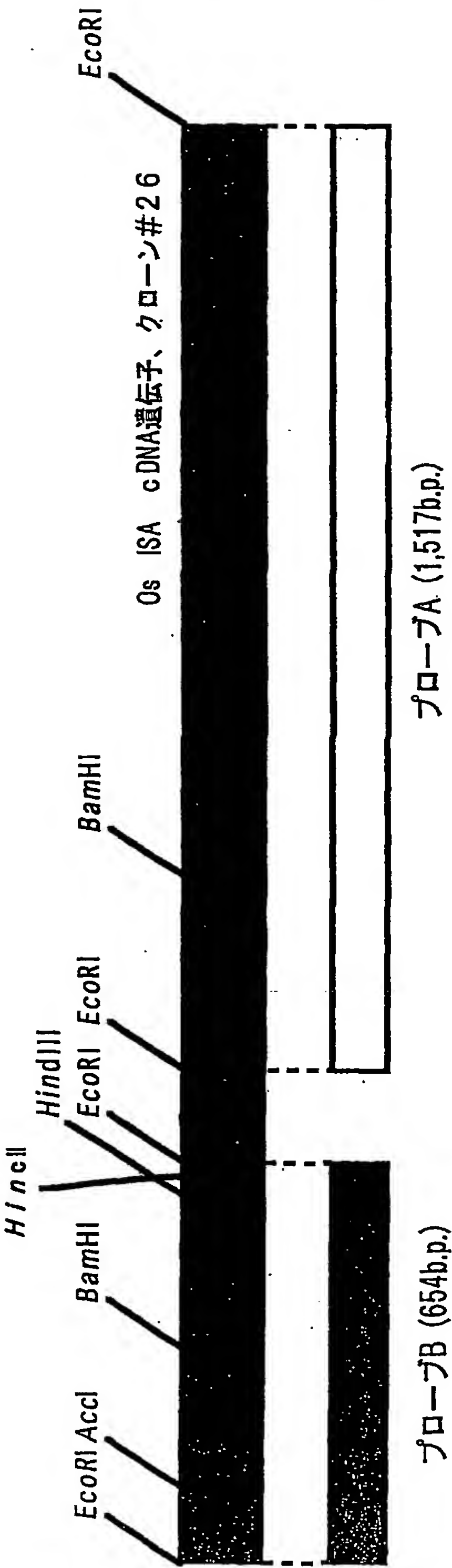
第 27 図



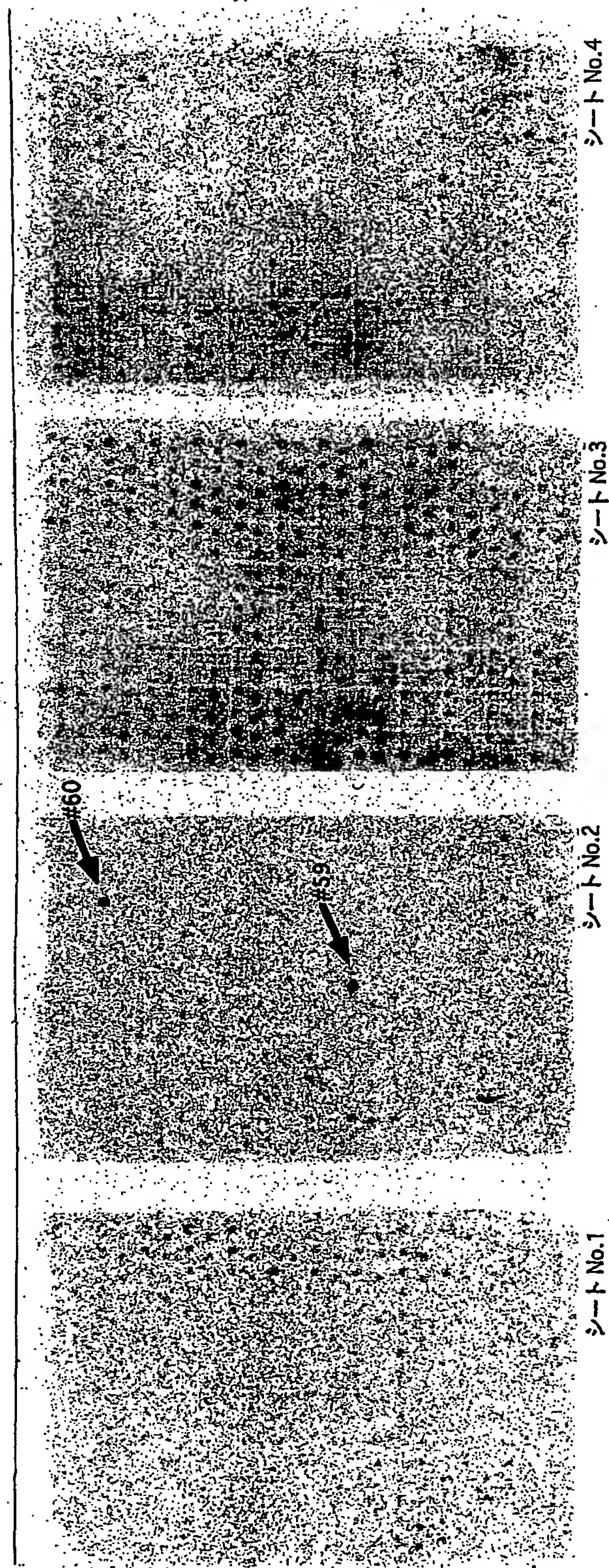
第 28 図



第 2 9 図

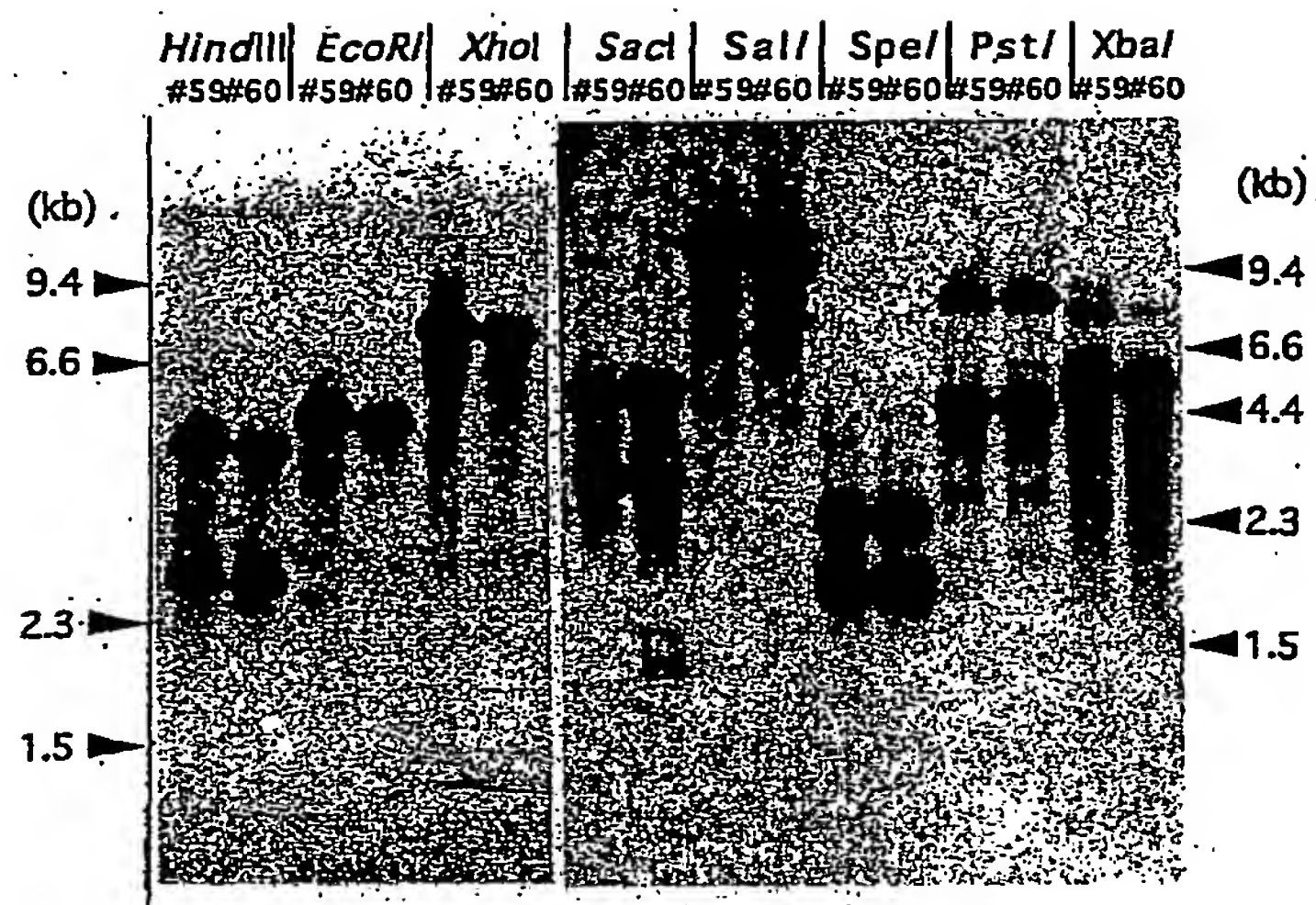


第 30 図



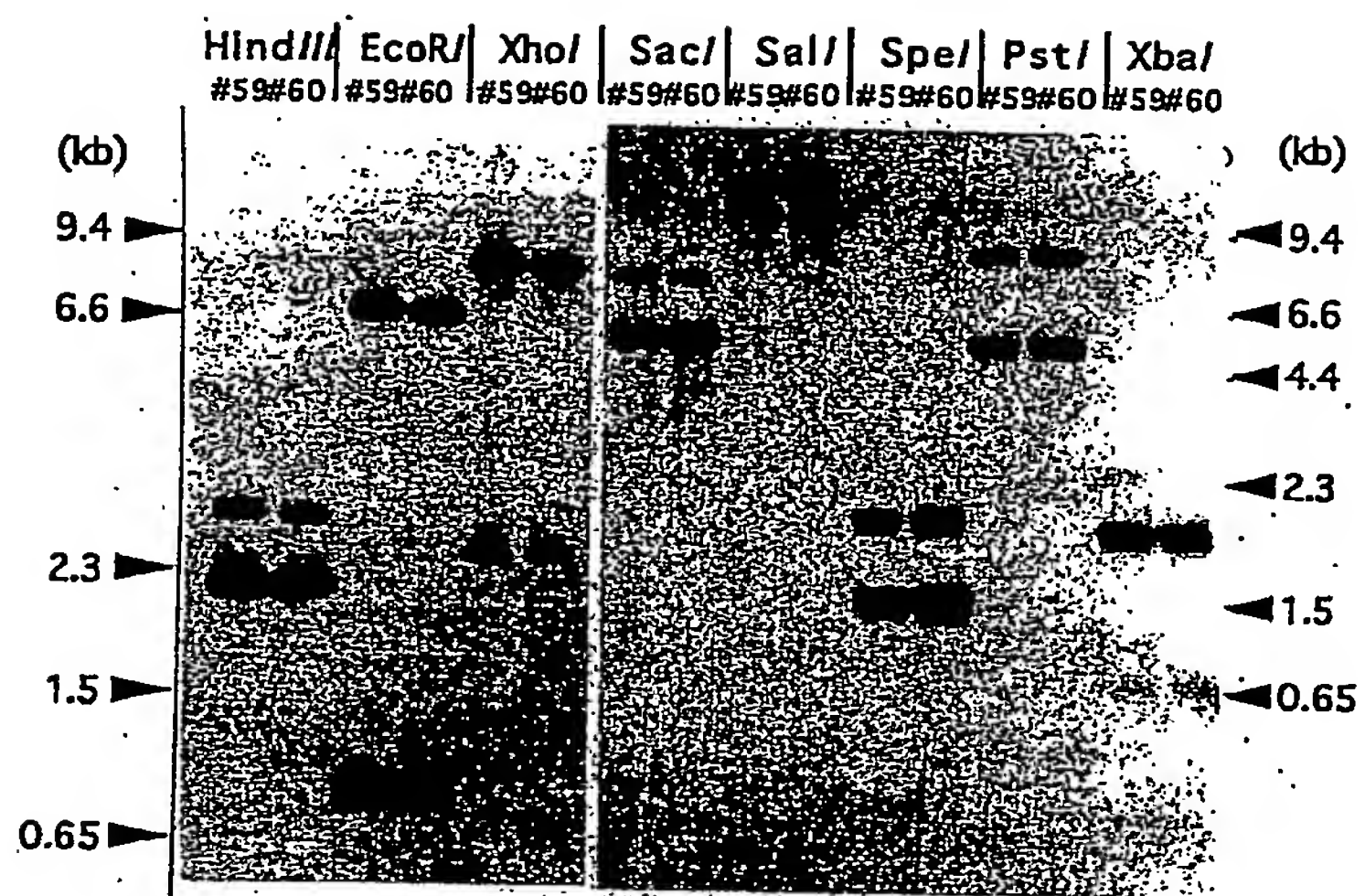
第 31 図

プローブA

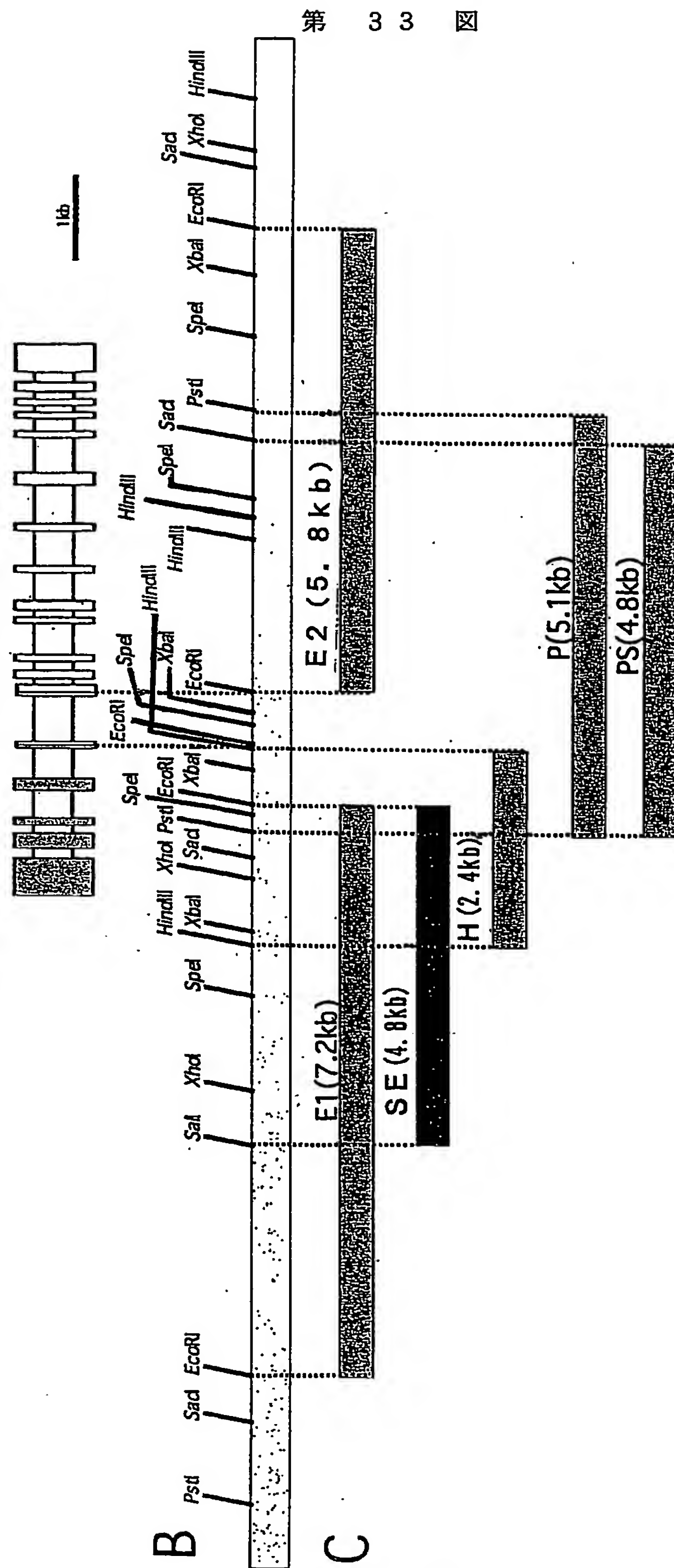


第 3 2 図

プローブB



A OsISA ゲノミック DNA 遺伝子



第 33 図

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Enzymes for starch synthesis.

<130> JA931868

<150> JP 2001-273166

<151> 2001-09-10

<150> JP 2001-277109

<151> 2001-09-12

<150> JP 2001-277120

<151> 2001-09-12

<150> JP 2001-287010

<151> 2001-09-20

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5935

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<400> 1

ctgcagttag gaggccgata gctcaagtt agcatgagag tttttttaa acaaatctct 60
tataatgattc cttttgtatt actaaaagt aacgatttta aaaaccgact caaatacgaa 120
tatgtatttc cgaaacaaa cgaacctaaa aactgactca tacacggata acgtaccgac 180
glaaacatct tcaattttta taatagcaga gatatagatt tcttacacat tagtcatcag 240
tctactattg aataatcaga taaatcaagt attttaagta ggaacaaaaa tttttatgaa 300
aatcgtgta taagtagtac catcttgacc gttcttgatt ttagccgtta ataaaattcg 360
attttctttc tattccttta gcacataata caacctacag taaatagtta aattggtaaa 420
tatataaaaa aatccatttt actcacttga actattttga tgaagcgctt aaacccttaa 480
ataatttttc atcctgtttt atacccccac ccccgaaact ttgaaagtgg ttccgcttat 540
tttctaacag catttctttt ttttatctct ctcgataag ttatatacgt ttgttcgact 600
accaatcttc gttgttaact ttctcaatat tcgtgccgtg tattattacg ccaataccgt 660
aaactagcga ctatggtttg tgtgtgtgtg atcattacct aattagagct agctctgcca 720
ccactgccat tctacctgta ttttaaacct gcatccgcaa ctggcacgcc atcgcccgac 780
ggctggactg gaggctgaa gcgaaccgga ttgtttctca cgtggataatg gtgcagcgct 840
gcacaccgag aagcttccac tggcaggtag tccccggctg tcagccagtt ctacggccgt 900
cgaagaaacg ttccgaggtt tgtttagcac gccggtttcc gtctgtcgct ggggacgtgg 960
gggttttgcc ccactttcca aaaccaccta ttcttccgag cgtgcacccc gagccgttaa 1020
cgtcacggac acgcgggccc cgcgaaacgg gtgaccccgcc atggcagaca aagtaactcg 1080
cttctggaga ggtggggccc tcggtcgagg ttcccgtagc ggacgacggg gaggggaaga 1140
gaagagaaga aacggctact cctccccgag cgccggggcgc ggatgcgttg gttttggggt 1200
tttggagcgt tgcggattgc cacggcgcac gccaccggtg gcgcacgcct tacaggtagc 1260
tccccgccc tctccccgc gtgcccctct cgccgtcgtc gctcgtgcc cattcatcc 1320
ccgcacggc acgcgcggga cgaaagcaaa gcacgcgcac acactcaaac ccgcgcctcc 1380
tccgctctcg tccgtcgctt cggttcggtt ccggctcgat cggggaggtt cctcggggcg 1440
accatgtcgt cggccgtcgt cgcgtcatcc accacgttcc tcgtcgcgt cgcctcttcg 1500

gcgtcacggg gagggcccag gagggggagg gtgggtgggcg tggccgcgcc gccggccctg 1560
cittacgacg gccgcgccgg aaggctagcc ctacggggcg cgccctccgcc ccggccctcg 1620
cctcggcgic gggaigcggg cgtgggtgcgc cgcgcggaig atggggagaa cgaggcggcg 1680
gtggagcggg cgggtgagga cgacgacgag gaggaggagt tctcttcggg cgcgtggcag 1740
ccgccccgct cgcgtcgcgg cggcgtcggc aaggtgggtt ggtgggtgic atcggggcg 1800
cgagatcgtc gtgctcgaga ggtgttctct gctttgattc gctttgatgt tticatttga 1860
aaccgacgcg tgtgcttgcg cgtgcgcgcg cigtgtttgc aggtcttgaa gcggaggggc 1920
accgtcccgc ccgtcggccg gtacggctcc ggcggtgatg cggcgagagi gcgcggggcg 1980
gccgcgccgg cgccggcgcc gacacaggac gccgcctcaa gtaagaacgg agcgcttctc 2040
agcggccgcg acgacgacac acctgcctca cggaacggat cggtcgttac cggcgccgac 2100
aagcctgccg ccgccacgcc gccggtgacc alaacgaagc tcccagcgcc ggactcccc 2160
gtgatccttc catccgtaga caagccgcag ccggagttcg tcatcccaga cgcgacggcg 2220
ccggcgccgc caccgcccgg ttcaaatccc aggtcgtccg ctccctctcc caagcctgac 2280
aatcgggaat ttgcagagga taagagcgca aaagtgttg agagtgcctc gaagccaaag 2340
gcgactagat ctccccctat tccgtcggtg gaagaggaga cgtgggattt caagaaat 2400
tttgatctga acgaaccgga cgccgcggag gatggcgatg acgatgatga ctgggctgat 2460
tcagatgcgt cagattctga gatcgaccag gatgacgatt cgggcccctt ggctggggag 2520
aatgtcatga acgtgatcgt ggtggctgct gaatgttctc cctgggtgaa aacaggcatg 2580
tacacgatai atacttcttt ttctcttttt ttgttcttct gatcttgtaa atttgcttca 2640
gttactgata tgaacaagtg ttgcatttgc acaggtgggc ttggagatgt tgcagggtgct 2700
ttacccaaag ctttggcgag gagaggacat cgtgttatgg tattactcct ttttctctc 2760
cttcatggtt ggaigtcttct tccattctta cagatttgat catttaatta acgtatattt 2820
tcagataiat aaatttggat caaatgtaaa gcagattagt tctcttaagt tcttttgttt 2880
acataatcat gatggcaaat taaaaaggct actccagctg ttagattcaa aatacaaaag 2940
taatatlgat aaatttgcaa atcgtactt gaaagctaaa ttgcttacta ttgttacaga 3000
aatgttcatt tctaacatgc tgttgaaaat atatacacta tggcgtagcc gcttagatca 3060
tcacgtggcc atggaaacta gtgccaaaag tagttctctt agttacacta gttacatacc 3120
tgtacatgat aacggatcag gcccatacaa ttagggatag attaggagcc cgttaacgaa 3180
ctaggccctt ataattaggg agggacggta gttacttttc gcataaggac atgctgcacg 3240

tggtgggagg aggggatgga aggaagacga ctctgctttt aagatagtag agaaatgtag 3300
caattttttt tagcaatttt agttatggta ataataataa ccacaacgta tticagagatc 3360
ggaaacgggg actctcggig acttctgat ataaactgat aactggcaaa tgcatctttc 3420
aatcttaggt tgtggtaacca aggtacggig attacgcgga agcccaggat gtaggaatca 3480
ggaaatacta caaggctgct ggacaggigt gtgtcaacaa tgcaatccaa gaagactggc 3540
ataggagacg caaatctctt agtaattggt ttttattttg gcctgcagga tctggaagt 3600
aaatatttcc atgcatttat cgaatggagt gatitgtgt tcatigacgc tctctcttc 3660
cgtcacgctc aggaatgacat ctatgggggg aacagacagg tgaagcttct atctgttttg 3720
tattacattg cattagtaaa acttaagtig catctcctag gcgtactgat ttgaaaatgc 3780
ttacccattc ccatcttcat tcaggaaatc atgaagcgca tgattctgtt ttglaaggct 3840
gctgttgagg tattttctcc aactccatta tcaatcatta atttggtttt aggaatgaga 3900
tgtatttgtt tggtttgagg attggtcaaa agcacaatc atttttctg ttgataaata 3960
gaagaagigt attaacittt ggactgaagc acacaataag taggagaaat gaggtcgcag 4020
tagatgattt gaatttgatc cctcaacaa acagcccgta aatgtttctg caagatttca 4080
cagagattca tattcttttt tattttaaat atattacaca ttatcgcaa atacacggat 4140
gaactccttc gatacctta gcagcatttc aacttgctac cgttcgtaat atgcaatgct 4200
cttgccaatg ttgtcataig tccccctaca aagggtata ttttctgttt ctgtacaatc 4260
ggcaggttcc ttggcacgtt ccatgcggig gtgtgcccta tggggatggc aacttggtgt 4320
tccttgcaaa cgattggcac actgcactcc tgccgtttta tctgaaggca tattacagag 4380
acaatggcat gatgcagtac actcgtctg tcttgtgat acataatat gcctaccagg 4440
ttttgttttt ctctctccc taatgaatca tctttattct atttgtatgc atctctgct 4500
gtttgttaga gaaattagtt gagtgcacaa attgtgggtc atggtaatta ttgagcaggg 4560
acacgataaa ctcttcttca gctattact acttttagtt cagcaatttc tccgtttcat 4620
attataattt ataagtcgtt ttttttctaa tcaaacatct ttacgtttga ttaactttat 4680
cgaaaaattt aacagcatct ataacatcaa attagtltta ttaaatataa tgtttaatgt 4740
aatttgatta tatgtttgtt ttgtattgga aatgttattg tatttttcta taaactaatt 4800
aaatttataa ctgtttaact taaaaaata tcaaaacaat ttacaataatg aaacgggccg 4860
gggagtlact tttttgtgtg ctaaatggtt cgtgtaatgt ttgtagggcc gtggccaggt 4920
agatgaattc ccctacatgg aattgccgga gcactacctg gatcacttca agctgtacga 4980

ccccgtcggc ggcgagcacg ccaacatctt cggcgcgggc ctgaagatgg cggaccgggt 5040
ggtgaccgtg agccccggct acctctggga gctgaagacg acggagggcg gctggggcct 5100
ccacgacatc atacgggaga acgactggaa gatgaacggc atcgtgaacg gcatcgacta 5160
ccgggagtgg aaccgggagg tggacgtgca cctgcagicc gacggctacg ccaactacac 5220
cgtggcctcg ctggactcca gcaagccgcg gtgcaaggcg gcgcigcagc gcgagctggg 5280
gctggaggig cgcgacgacg tggcgtgat cgggttcatc gggcggctcg acgggcagaa 5340
agggtgtggac atcatcggcg acgcgatgcc gtggatcgcc gggcaggacg tgcagctggt 5400
gctgctgggc tccggccgcc gcgacctgga ggtgatgctg cagcggttcg aggccgagca 5460
caacagcaag gtgcgcgggt ggggtggggt ctcggtgaag atggcgcacc ggatcacggc 5520
gggcgccgac gtgctgggtca tggcgtcgcg gttcgagccg tgcggcctca accagctcta 5580
cgccatggcg tacggcacccg tccccgtcgt gcacgccgtc ggcgggctga gggacaccai 5640
gtcggcggtc gacccgttcg aggacaccgg cctcgggtgg acgttcgacc gcgccgagcc 5700
gcacaagctc atcgaggcgc tcggccactg cctcgagacg taccgcaagt acaaggagag 5760
ctggaggggg ctccagggtc gcggcatgtc gcaggacctc agctgggacc acgccgccga 5820
gctctacgag gaggtccttg tcaaggccaa gtaccaatgg tgaagagacc atgtccgcc 5880
gcggctccg cctgcgcgtt cggcagctat agctatagcc tccctgaaga agctt 5935

<210> 2

<211> 5928

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<400> 2

ctgcagttag gaticcgatc gtctcaagtt agcatgagag tttttttaa acaaatttct 60
tataatgatt cttttgtatt actaaaagtg aacgatttta aaaaccgact caaatacgaa 120
tatgtatttc tgaaaccaaa cgaacctaaa aactaactca tacacggata acgtaccgac 180
gtaaacatct ttaattttta taatagcaga aatatagatt tcttacacat tagtcatcag 240
tctactattg aataatcaga taaatcaagt attttaagta ggaacaaaaa attttatgaa 300

aattcgtgta taagtaglac catittgacc gtttctgatt ttagccgtaa ataaaattcg 360
attttctttc taitccttta gcacataata cagcciacag taaatagtia aattgataaa 420
tatataaaaa aaiccatitt actcactiga actatittga tgaagcgctt aaaccctaa 480
ataatttttc atcccgtttt atacccccac tcccgaacta ttgaaagtgg ttccgcttat 540
tttctaaccg catittcttt tttatctct ctcgtataag ttatatacgt ttgttcgact 600
accaatctta gtgtttaact ticttaatat tctgtccatg tattattacg ccaataccgt 660
aaactagcga ctaiggtttg tgtgtgttgt atcattacct aagctctgcc accactgcca 720
ttctacctgt attttaaac tcatccgcaa ctggcacgcc atcgcccgac ggctggactg 780
gagtcgtgaa gcgaaccgga ttgttctca cgtggataatg ctgcagcgct gcacaccgcg 840
aagcttccac tggcaggtgg tccccggctg tcagccagtt ctacggccgt cgaagaaacg 900
ttccgagggt tgtttagcac gccggtttcc gtctgtgcgt ggggacgtgg gggttttgcc 960
ccactttcca aaaccacctt ttctccgcg cgtgcacccc gagccgttaa cgtcaccgac 1020
acgcggggccc cgcgaaacgg gtgaccccg c atggcagaca aagtaactcg ctcttgaga 1080
ggtagggccc tcggtcgagg ttcccgtagc ggacgacggg aaggggaga gaagagaaga 1140
aacggctact cctccccgcg cgccgcgcgc ggctgcgtt gttttgggtt tttaggagct 1200
tgcggattgc cacggcgcac gccaccggtg gcgcacgctt tacaggtagc tccccgccc 1260
tctccccgc gtgcccctt cgccgtcgtc gctcgtcgc catttcatcc cccgctcggc 1320
acgcgcggga cgaaagcaaa gcacgcgcac acactcaaac ccgcgcctcc tccgctctcg 1380
tccgtcgtt cggttcggtt ccggctcgat cggggagggt cctcggggcg accatgtcgt 1440
cggccgtcgt cgcgtcatcc accacgttcc tcgtcgcgt cgcctcttc gcgtcacggg 1500
gagggcccag gagggggagg gtggtagggc tggccgcgcc gccggccctg ctttacgacg 1560
gccgcgccgg aaggctagcc ctacgggcgc cgcctccgcc ccggccctcg cctcggcgtc 1620
gggatgcggg cgtggtagcg cgcgcggaatg atggggagaa cgaggcggcg gtggagcggg 1680
cgggtgagga cgacgaggag gaggaggagt tctcttcggg cgcgtggcac ccgccccgt 1740
cgcgtcgcgg cggcgtcggc aaggtaggtt ggtggtagtc atcggggcg cgagatcgtc 1800
gtgctcgaga ggtgttctt gctttgattc gctttgatgt ttctgtttga aaccgacgcg 1860
tgtgcttgcg cgtgcgcgcg ctgtgtttgt aggtcttgaa gcggaggggc accgtccgcg 1920
ccgtcggccg gtacggctcc ggcggtgacg cggcgagagt gcgcggggcg gccgcgccgg 1980
cgccggcgcc gacacaggac gccgcctcaa gtaagaacgg agcgcttctc agcggccgcg 2040

acgacgacac accigccitca cggaacggat cggtcgttac cggcgccgac aagcctgccg 2100
ccgccacgcc gccggtgacc ataacgaagc tcccagcgcc ggactcccc gigatccitc 2160
catecgtaga caagccgcag ccggagttcg tcaicccaga cgcgacggcg ccggcgccgc 2220
caccgcccgg ticaaatccc aggtcgtccg ctccctctccc caagccigac aattcggaat 2280
ttgcagagga taagagcgca aaagttgttg agagtgcctc gaagccaaag gcgactagat 2340
cttcccctat tcttgcggta gaagaggaga cgigggaatt caagaaat at ttgatctga 2400
acgaaccgga cgccgcggag gatggcgatg acgatgatga ctgggcigat tcagatgcgt 2460
cagattctga gatcgaccag gatgacgatt cgggcccitt ggctggggag aatgicatga 2520
acgtgatcgt ggiggctgct gaatgtctc cctgggtgcaa aacaggcatg tacacgatat 2580
atacttcttt tttctctttt ttgttcttct gatcttgtaa atttgcttca gtiactgata 2640
tgaacaagtg ttgcatttgc acaggtaggc ttggagaagt tgcaggctgt ttacccaaag 2700
ctttggcgag gagaggacat cgtgttatgg tattactcct tttttctctc cticatggtt 2760
ggatgttctt tccattctta cagatttgat catttaatta acgtatattt tcagatatat 2820
aaatttggat caaatgtaaa gcagattagt tctcttatgt tcttttgttt acataatcat 2880
gatggcaaat taaaaaggct actccagctg ttagattcaa aatacaaaag taatatgat 2940
aaatttgcaa atctgtactt gaaagctaaa ttgcttacta ttgttacaga aatgttcatt 3000
tctaacaatgc tgttgaaaat atatacacta tggcgtagcc gcttagatca tcacgtggcc 3060
atggaaacta gtagccaaaag tagttctctt agttacacta gttacatacc tgtacatgat 3120
aacggatcag gcccatacaa ttagggatag attaggagac cgttaacgaa ctaggccctt 3180
ataattaggg agcgacggta gtiactttc gcataaggac acgtgcacg cgttgggagg 3240
aggggatgga aggaagacaa cticgctttt aagatagtag agaaatgtag caattttttt 3300
ttagcaattt tagttatggt aataatataa accacaacgt attcagaaat cggaaacggg 3360
gactctcggg gacttccctga tataaactga taactggcaa atgcatcttt caatcttagg 3420
ttgtggtacc aaggtaggtt gattacgcgg aagcccagga tgtaggaatc aggaaatact 3480
acaaggctgc tggacagggt tgtgtcaaca atgcaatcca agaagactgg cataggagac 3540
gcaaattcct tagtaatttg tttttatttt ggctgcagg atctggaagt gaaatatttc 3600
catgcattta tcgatggagt tgattttgtg ttcatgtacg ctccctctctt ccgtcaccgt 3660
caggatgaca tctatggggg gaacagacag gtgaagcttc tatctgtttg gtattacatt 3720
gcattagtaa aacttaagtt gcatctccta ggcgtactga ttgaaaatg cttaccatt 3780

cccatittca ttcaggaaat catgaagcgc atgattcigt ttigttaaggc tgcigttag 3840
gtattttctc caactccatt atcaatcatt aatttggttt taggaatgag atgtatttgt 3900
ttggtttag gaaiggtcaa aagcacaaat catttttct gtigataaat agaagaagt 3960
tattaaacttt tggactgaag cacacaataa gtaggagaaa tgaggtcgca gtaatgat 4020
ttgaatttga tccctcaaac aaacagcccg taaatgtttc tgcaagattt cacagagatt 4080
catattcttt tttattttta atataattaca cattatcgcc aaatacacgg atgaactcct 4140
tcgataacctc tagcagcatt tcaaccigt acagttcgta atatgcaatg ctcttgccaa 4200
tgttgicata tgttcccccia caaagggtc tattttcigt ttctgtacaa tcggcaggtt 4260
ccttggcacg ttccatgcgg tgggtgtgcc tatggggatg gcaacttggg gticcttgca 4320
aacgattggc acactgcact ccgtccgtgt tatctgaagg catattacag agacaatggc 4380
atgatgcagt acactcgctc tgtccttggt atacataata tcgcttacca ggtttttttt 4440
ttctctctc cctaataaat catctttatt ctatttgtat gcatctcctg ctgtttgtta 4500
gagaaattag ttgagtgcac aaattgtggg tcatggtaat tattgagcag ggacacgata 4560
aacctttctt cagtctatta ctacttttag ttcagcactt tcttcgtttc atattataat 4620
ttataagtcg ttttttttct aatcaaacat ctttacgttt gattaagttt atagaaaaat 4680
ttaacagcat ctataacatc aaattagttt aattaaatat aatgtttaat gtaatttgat 4740
tataatgttg ttttgtattg gaaatgttat tataattttc tataaactaa ttaaatttaa 4800
aacgttttaa cttaaaaaaa tatcaaaaca atttacaata tgaaacgtgc cggggagtac 4860
tttttttggt atgctaaatg gttcgtgtta tgtttgtagg gccgtggccc agtagatgaa 4920
ttcccttaca tggaaatgcc ggagcactac ctggatcact tcaagctgtc cgaccccgct 4980
ggcggcgagc acgccaacat cttcggcgcg ggcttgaaga tggcggaccg ggtggtgacc 5040
gtgagccccg gctacctctg ggagctgaag acgacggagg gcggctgggg cctccacgac 5100
atcatacggg agaacgactg gaagaigaac ggcatcgtga acggcatcga ctaccgggag 5160
tggaaaccgg aggtggacgt gcacctgcag tccgacggct acgccaacta caccgtggcc 5220
tcgctggact ccggcaagcc gcggtgcaag gcggcgctgc agcgcgagct ggggctggag 5280
gtgcgcgacg acgtgccgct gatcgggttc atcgggcggc tcgacgggca gaaaggggtg 5340
gacatcatcg gcgacgcgat gccgtggatc gccgggcagg acgtgcagct ggtgctgctg 5400
ggctccggcc gccgcgacct ggaggtgatg ctgcagcggc tcgaggcgca gcacaacagc 5460
aagggtgcgc ggtgggtggg gtctcgggtg aagatggcgc accggatcac ggcgggcgcc 5520

gacgtgctgg tcaigccgtc gcggttcgag ccgtgcggcc tcaaccagct ctacgccatg 5580
gcgtacggca ccgtcccggt cgtgcacgcc gtcggcgggc tgagggacac cgtgtcggcg 5640
ttcgaccgt tcgaggacac cggcctcggg tggacgttcg accgcgccga gccgcacaag 5700
ctcatcgagg cgctcggcca ctgcctcgag acgtaccgca agtacaagga gagctggagg 5760
gggtccagg tgcgcggcat gtcgcaggac ctacgtggg accacgccgc cgagctctac 5820
gaggaggicc ttgtcaaggc caagtaccaa tggtagaagag accatgtccg cccgcgggtct 5880
ccgcctgcgc gttcggcagc tatagctata gcctccctga agaagctt 5928

<210> 3

<211> 2607

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<400> 3

gaaagcaaag cacgcgcaca cactcaaacc cgcgcctcct ccgtctcgt ccgtcgttc 60
ggttcggttc cggctcgatc ggggagggtc ctcggggcga ccatgtcgtc ggccgtcgtc 120
gcgtcatcca ccacgttcct cgtcgcgctc gcctcttcgg cgtcacgggg agggcccagg 180
agggggaggg tggtagggcgt ggccgcgccg ccggccctgc ttacgacgg ccgcgccgga 240
aggctagccc tacgggcgcc gcctccgccc cggcctcggc ctcggcgtcg ggatgcgggc 300
gtggtgcgcc gcgcggaiga tggggagaac gaggcggcgg tggagcgggc gggtgaggac 360
gacgacgagg aggaggagtt ctcttcgggc gcgtggcagc cgcgccgtc gcgtcgcggc 420
ggcgtcggca aggtcttgaa gcggaggggc accgtcccgc ccgtcggccg gtacggctcc 480
ggcggtagat cggcgagagt gcgcggggcg gccgcgccgg cgcgggcgcc gacacaggac 540
gccgcctcaa gtaagaacgg agcgttctc agcggccgcg acgacgacac acctgccitca 600
cggaacggat cggtcgttac cggcgccgac aagcctgccg ccgccacgcc gccggtagacc 660
ataacgaagc tcccagcgcc ggactcccc gtgatcctc catccgtaga caagccgcag 720
ccggagttcg tcatcccaga cgcgacggcg ccggcgccgc caccgcccgg ttcaaattccc 780
aggtcgtccg ctctctccc caagcctgac aattcggaat ttgcagagga taagagcgca 840

aaagtigtg agagtgtcc gaagccaaag gcgactagat ctccccctat tcctgcggta 900
gaagaggaga cgtgggattt caagaaatat ttigtatcga acgaaccgga cgccgcggag 960
gatggcgaatg acgatgatga ctgggctgat tcagatgcgt cagattctga gatcgaccag 1020
gatgacgatt cgggcccctt ggctggggag aatgtcatga acgtgatcgt ggtggctgct 1080
gaatgttctc cctggigcaa aacaggtggg ctggagatg ttgcaggcgc ttaccctaaa 1140
gctttggcga ggagaggaca tcgtgttatg gttgtggtac caaggctacg tgattacgcg 1200
gaagcccagg atgtaggaat caggaaatc tacaaggctg ctggacagga tctggaagtg 1260
aaataatttc atgcatttat cgatggagtt gattttgtgt tcatgacgc tcctctcttc 1320
cgtcaccgtc aggatgacat ctatgggggg aacagacagg aaatcatgaa gcgcatgatt 1380
ctgttttgtt aggcctgctg tgaggcttct tggcacgttc catgcggtgg tgtgccctat 1440
gggatggca acttgggtgt ccttgcaaac gattggcaca ctgcactcct gccctgtttat 1500
ctgaaggcat attacagaga caatggcatg atgcagtaca ctgcctctgt ccttgtgata 1560
cataataatc ctiaccaggg ccgtggccca gtagatgaat tccccctacat ggaattgccg 1620
gagcactacc tggatcacit caagcgttac gaccccgctc gcggcgagca cgccaacatc 1680
ttcggcgcg gacctgaagat ggccgaccgg gtgggtgaccg tgagccccgg ctacctctgg 1740
gagctgaaga cgacggaggg cggctggggc ctccacgaca tcatacggga gaacgactgg 1800
aagatgaacg gcatcgtgaa cggcatcgac taccgggagt ggaaccggga ggtggacgtg 1860
cacctgcagt ccgacggcta cgccaactac accgtggcct cgtgggactc cagcaagccg 1920
cggtgcaagg cggcgctgca gcgcgagctg gggctggagg tgcgcgacga cgtgccgctg 1980
atcgggttca tcgggcggct cgacgggcag aaaggltgtg acatcatcgg cgacgcgatg 2040
ccgtggatcg ccgggcagga cgtgcagctg gtgctgctgg gctccggccg ccgcgacctg 2100
gaggtagatc tgcagcggtt cgaggcgag cacaacagca aggtgcgcgg gtgggtgggg 2160
ttctcggtag agatggcgca ccggatcacg gcgggcgccc acgtgctggt catgccgtcg 2220
cggttcgagc cgtgcggcct caaccagctc tacgccatgg cgtacggcac cgtccccgtc 2280
gtgcacgccg tcggcgggct gagggacacc atgtcggcgt tcgacccgtt cgaggacacc 2340
ggcctcgggt ggacgttcga ccgcgccgag ccgcacaagc tcatcgaggc gctcggccac 2400
tgccctcgaga cgtaccgcaa gtacaaggag agctggaggg ggctccaggt gcgcggcatg 2460
tcgcaggacc tcagctggga ccacgccgcc gagctctacg aggaggtcct tgtcaaggcc 2520
aagtaccaat ggtgaagaga ccatgtccgc ccgcggctc cgccctgcgcg ttcggcagct 2580

atagctatag cctccctgaa gaagctt

2607

<210> 4

<211> 2607

<212> DNA

<213> oryza sativa

<400> 4

gaaagcaaag cacgcgcaca cactcaaacc cgcgcctcct ccgctctcgt ccgtcgttc 60
ggttcggttc cggctcgatc ggggagggtc ctcggggcga ccatgtcgtc ggccgtcgtc 120
gcgtcatcca ccacgttcct cgtcgcgtc gcccttcgg cgtcacgggg agggcccagg 180
agggggaggg tggggggcgt ggccgcgccg ccggccctgc ttacgacgg ccgcgccgga 240
aggctagccc tacgggcgcc gccctcgccc cggcctcggc ctcggcgtcg ggaatgcgggc 300
gtgggtgcgcc gcgcggatga tggggagAAC gaggcggcgg tggagcgggc gggtagaggac 360
gacgaggagg aggaggagtt ctcttcgggc gcgtggcacc cggcccgctc gcgtcgcggc 420
ggcgtcggca aggtcttgaa gcggaggggc accgtccgc ccgtcggccg gtacggctcc 480
ggcggtgacg cggcgagagt gcgcggggcg gccgcgccgg cggcggcgcc gacacaggac 540
gccgcctcaa gtaagaacgg agcgtctc agcggccgcg acgacgac accigcctca 600
cggaacggat cggtcgttac cggcgccgac aagcctgccg ccgccacgcc gccggtagacc 660
ataacgaagc tcccagcgcc ggactcccc gtgatccttc catccgtaga caagccgcag 720
ccggagttag tcatcccaga cgcgacggcg ccggcgccgc caccgcccgg ttcaaatccc 780
aggtcgtccg ctccctccc caagcctgac aattcggaat ttgcagagga taagagcgca 840
aaagtgttg agagtgtcc gaagccaaag gcgactagat ctccccctat tcctgcggta 900
gaagaggaga cgtgggattt caagaaatat ttgatctga acgaaccgga cggcgcgag 960
gatggcgatg acgatgatga ctgggctgat tcagatgcgt cagattctga gatcgaccag 1020
gatgacgatt cgggcccctt ggctggggag aatgtcatga acgtgatcgt ggtggctgct 1080
gaatgtctc cctggtgcaa aacagggtgg ctggagatg ttgcaggtag ttaccctaaa 1140
gctttggcga ggagaggaca tcgtgttatg gttgtggtag caaggtacgg tgattacgcg 1200

gaagcccagg atgtaggaaat caggaaatac tacaaggctg ctggacagga tctggaagtg 1260
aaataattcc atgcaatttat cgatggagtt gatatttgtt tcaattgacgc tccctctcttc 1320
cgicaccgtc aggaatgacat ctatgggggg aacagacagg aaatcaigaa gcgcatgatt 1380
ctgtttttgta aggctgctgt tgaggttcct tggcacgttc catgcggttg tgtgccctat 1440
ggggaatggca acitggigtgt ccttgcaaac gatitggcaca ctgcactcct gcctgtttat 1500
ctgaaggcat attacagaga caatggcatg atgcagtaca ctgcctctgt ccttgtgata 1560
cataatatcg cttaccaggg ccgtggccca gtagaigaa tccctacat ggaattgccg 1620
gagcactacc tggatcactt caagctgtac gaccccgctg gcggcgagca cgccaacatc 1680
ttcggcgcggt gcctgaagat ggcggaccgg gtggtagacc tgagccccgg ctacctctgg 1740
gagctgaaga cgacggaggg cggctggggc ctccacgaca tcatacggga gaacgactgg 1800
aagatgaacg gcatcgtgaa cggcatcgac taccgggagt ggaaccggga ggtaggacgtg 1860
cacctgcagt ccgacggcta cgccaactac accgtggcct cgttggaact cggcaagccg 1920
cggtagcaagg cggcgctgca gcgcgagctg gggctggagg tgcgcgacga cgtgccgctg 1980
atcgggttca tcgggcggct cgacgggcag aaaggggttg acatcatcgg cgacgcgatg 2040
ccgtggatcg ccgggcagga cgtgcagctg gtgctgctgg gctccggccg ccgcgacctg 2100
gaggtgatgc tgcagcggtt cgaggcgag cacaacagca aggtgcgcgg gtgggtgggg 2160
ttctcggtga agatggcgca ccggatcacg gcgggcgccc acgtgctggt catgccgtcg 2220
cggttcgagc cgtgcggcct caaccagctc tacgccaatgg cgtacggcac cgtccccgtc 2280
gtgcacgccc tcggcgggct gagggacacc gtgtcggcgt tcgaccgtt cgaggacacc 2340
ggcctcgggt ggacgttcga ccgcgccgag ccgcacaagc tcatcgagga gctcggccac 2400
tgccctgaga cgtaccgcaa gtacaaggag agctggaggg ggctccaggt gcgcggcatg 2460
tcgcaggacc tcagctggga ccacgccgcc gagctctacg aggaggtcct tgtcaaggcc 2520
aagtaccaat ggtgaagaga ccatgtccgc ccgcggcttc cgcctgcgcg ttcggcagct 2580
atagctatag cctccctgaa gaagctt 2607

<210> 5

<211> 810

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 5

Met Ser Ser Ala Val Val Ala Ser Ser Thr Thr Phe Leu Val Ala Leu

1 5 10 15

Ala Ser Ser Ala Ser Arg Gly Gly Pro Arg Arg Gly Arg Val Val Gly

20 25 30

Val Ala Ala Pro Pro Ala Leu Leu Tyr Asp Gly Arg Ala Gly Arg Leu

35 40 45

Ala Leu Arg Ala Pro Pro Pro Pro Arg Pro Arg Pro Arg Arg Arg Asp

50 55 60

Ala Gly Val Val Arg Arg Ala Asp Asp Gly Glu Asn Glu Ala Ala Val

65 70 75 80

Glu Arg Ala Gly Glu Asp Asp Asp Glu Glu Glu Glu Phe Ser Ser Gly

85 90 95

Ala Trp Gln Pro Pro Arg Ser Arg Arg Gly Gly Val Gly Lys Val Leu

100 105 110

Lys Arg Arg Gly Thr Val Pro Pro Val Gly Arg Tyr Gly Ser Gly Gly

115 120 125

Asp Ala Ala Arg Val Arg Gly Ala Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr

130 135 140

Gln Asp Ala Ala Ser Ser Lys Asn Gly Ala Leu Leu Ser Gly Arg Asp
145 150 155 160

Asp Asp Thr Pro Ala Ser Arg Asn Gly Ser Val Val Thr Gly Ala Asp
165 170 175

Lys Pro Ala Ala Ala Thr Pro Pro Val Thr Ile Thr Lys Leu Pro Ala
180 185 190

Pro Asp Ser Pro Val Ile Leu Pro Ser Val Asp Lys Pro Gln Pro Glu
195 200 205

Phe Val Ile Pro Asp Ala Thr Ala Pro Ala Pro Pro Pro Gly Ser
210 215 220

Asn Pro Arg Ser Ser Ala Pro Leu Pro Lys Pro Asp Asn Ser Glu Phe
225 230 235 240

Ala Glu Asp Lys Ser Ala Lys Val Val Glu Ser Ala Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Ala Thr Arg Ser Ser Pro Ile Pro Ala Val Glu Glu Glu Thr Trp Asp
260 265 270

Phe Lys Lys Tyr Phe Asp Leu Asn Glu Pro Asp Ala Ala Glu Asp Gly
275 280 285

Asp Asp Asp Asp Asp Trp Ala Asp Ser Asp Ala Ser Asp Ser Glu Ile

290	295	300
Asp Gln Asp Asp Asp Ser Gly Pro Leu Ala Gly Glu Asn Val Met Asn		
305	310	315 320
Val Ile Val Val Ala Ala Glu Cys Ser Pro Trp Cys Lys Thr Gly Gly		
	325	330 335
Leu Gly Asp Val Ala Gly Ala Leu Pro Lys Ala Leu Ala Arg Arg Gly		
	340	345 350
His Arg Val Met Val Val Val Pro Arg Tyr Gly Asp Tyr Ala Glu Ala		
	355	360 365
Gln Asp Val Gly Ile Arg Lys Tyr Tyr Lys Ala Ala Gly Gln Asp Leu		
	370	375 380
Glu Val Lys Tyr Phe His Ala Phe Ile Asp Gly Val Asp Phe Val Phe		
	385	390 395 400
Ile Asp Ala Pro Leu Phe Arg His Arg Gln Asp Asp Ile Tyr Gly Gly		
	405	410 415
Asn Arg Gln Glu Ile Met Lys Arg Met Ile Leu Phe Cys Lys Ala Ala		
	420	425 430
Val Glu Val Pro Trp His Val Pro Cys Gly Gly Val Pro Tyr Gly Asp		
	435	440 445

Gly Asn Leu Val Phe Leu Ala Asn Asp Trp His Thr Ala Leu Leu Pro
450 455 460

Val Tyr Leu Lys Ala Tyr Tyr Arg Asp Asn Gly Met Met Gln Tyr Thr
465 470 475 480

Arg Ser Val Leu Val Ile His Asn Ile Ala Tyr Gln Gly Arg Gly Pro
485 490 495

Val Asp Glu Phe Pro Tyr Met Glu Leu Pro Glu His Tyr Leu Asp His
500 505 510

Phe Lys Leu Tyr Asp Pro Val Gly Gly Glu His Ala Asn Ile Phe Gly
515 520 525

Ala Gly Leu Lys Met Ala Asp Arg Val Val Thr Val Ser Pro Gly Tyr
530 535 540

Leu Trp Glu Leu Lys Thr Thr Glu Gly Gly Trp Gly Leu His Asp Ile
545 550 555 560

Ile Arg Glu Asn Asp Trp Lys Met Asn Gly Ile Val Asn Gly Ile Asp
565 570 575

Tyr Arg Glu Trp Asn Pro Glu Val Asp Val His Leu Gln Ser Asp Gly
580 585 590

Tyr Ala Asn Tyr Thr Val Ala Ser Leu Asp Ser Ser Lys Pro Arg Cys
595 600 605

Lys Ala Ala Leu Gln Arg Glu Leu Gly Leu Glu Val Arg Asp Asp Val
610 615 620

Pro Leu Ile Gly Phe Ile Gly Arg Leu Asp Gly Gln Lys Gly Val Asp
625 630 635 640

Ile Ile Gly Asp Ala Met Pro Trp Ile Ala Gly Gln Asp Val Gln Leu
645 650 655

Val Leu Leu Gly Ser Gly Arg Arg Asp Leu Glu Val Met Leu Gln Arg
660 665 670

Phe Glu Ala Gln His Asn Ser Lys Val Arg Gly Trp Val Gly Phe Ser
675 680 685

Val Lys Met Ala His Arg Ile Thr Ala Gly Ala Asp Val Leu Val Met
690 695 700

Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Asn Gln Leu Tyr Ala Met Ala
705 710 715 720

Tyr Gly Thr Val Pro Val Val His Ala Val Gly Gly Leu Arg Asp Thr
725 730 735

Met Ser Ala Phe Asp Pro Phe Glu Asp Thr Gly Leu Gly Trp Thr Phe
740 745 750

Asp Arg Ala Glu Pro His Lys Leu Ile Glu Ala Leu Gly His Cys Leu

755 760 765

Glu Thr Tyr Arg Lys Tyr Lys Glu Ser Trp Arg Gly Leu Gln Val Arg
770 775 780

Gly Met Ser Gln Asp Leu Ser Trp Asp His Ala Ala Glu Leu Tyr Glu
785 790 795 800

Glu Val Leu Val Lys Ala Lys Tyr Gln Trp
805 810

<210> 6
<211> 810
<212> PRT
<213> Oryza sativa

<400> 6

Met Ser Ser Ala Val Val Ala Ser Ser Thr Thr Phe Leu Val Ala Leu
1 5 10 15

Ala Ser Ser Ala Ser Arg Gly Gly Pro Arg Arg Gly Arg Val Val Gly
20 25 30

Val Ala Ala Pro Pro Ala Leu Leu Tyr Asp Gly Arg Ala Gly Arg Leu
35 40 45

Ala Leu Arg Ala Pro Pro Pro Pro Arg Pro Arg Pro Arg Arg Arg Asp
50 55 60

Ala Gly Val Val Arg Arg Ala Asp Asp Gly Glu Asn Glu Ala Ala Val
65 70 75 80

Glu Arg Ala Gly Glu Asp Asp Glu Glu Glu Glu Glu Phe Ser Ser Gly
85 90 95

Ala Trp His Pro Pro Arg Ser Arg Arg Gly Gly Val Gly Lys Val Leu
100 105 110

Lys Arg Arg Gly Thr Val Pro Pro Val Gly Arg Tyr Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Asp Ala Ala Arg Val Arg Gly Ala Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr
130 135 140

Gln Asp Ala Ala Ser Ser Lys Asn Gly Ala Leu Leu Ser Gly Arg Asp
145 150 155 160

Asp Asp Thr Pro Ala Ser Arg Asn Gly Ser Val Val Thr Gly Ala Asp
165 170 175

Lys Pro Ala Ala Ala Thr Pro Pro Val Thr Ile Thr Lys Leu Pro Ala
180 185 190

Pro Asp Ser Pro Val Ile Leu Pro Ser Val Asp Lys Pro Gln Pro Glu
195 200 205

Phe Val Ile Pro Asp Ala Thr Ala Pro Ala Pro Pro Pro Gly Ser
210 215 220

Asn Pro Arg Ser Ser Ala Pro Leu Pro Lys Pro Asp Asn Ser Glu Phe
225 230 235 240

Ala Glu Asp Lys Ser Ala Lys Val Val Glu Ser Ala Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Ala Thr Arg Ser Ser Pro Ile Pro Ala Val Glu Glu Glu Thr Trp Asp
260 265 270

Phe Lys Lys Tyr Phe Asp Leu Asn Glu Pro Asp Ala Ala Glu Asp Gly
275 280 285

Asp Asp Asp Asp Asp Trp Ala Asp Ser Asp Ala Ser Asp Ser Glu Ile
290 295 300

Asp Gln Asp Asp Asp Ser Gly Pro Leu Ala Gly Glu Asn Val Met Asn
305 310 315 320

Val Ile Val Val Ala Ala Glu Cys Ser Pro Trp Cys Lys Thr Gly Gly
325 330 335

Leu Gly Asp Val Ala Gly Ala Leu Pro Lys Ala Leu Ala Arg Arg Gly
340 345 350

His Arg Val Met Val Val Val Pro Arg Tyr Gly Asp Tyr Ala Glu Ala
355 360 365

Gln Asp Val Gly Ile Arg Lys Tyr Tyr Lys Ala Ala Gly Gln Asp Leu

370	375	380	
Glu Val Lys Tyr Phe His Ala Phe Ile Asp Gly Val Asp Phe Val Phe			
385	390	395	400
Ile Asp Ala Pro Leu Phe Arg His Arg Gln Asp Asp Ile Tyr Gly Gly			
	405	410	415
Asn Arg Gln Glu Ile Met Lys Arg Met Ile Leu Phe Cys Lys Ala Ala			
	420	425	430
Val Glu Val Pro Trp His Val Pro Cys Gly Gly Val Pro Tyr Gly Asp			
	435	440	445
Gly Asn Leu Val Phe Leu Ala Asn Asp Trp His Thr Ala Leu Leu Pro			
	450	455	460
Val Tyr Leu Lys Ala Tyr Tyr Arg Asp Asn Gly Met Met Gln Tyr Thr			
465	470	475	480
Arg Ser Val Leu Val Ile His Asn Ile Ala Tyr Gln Gly Arg Gly Pro			
	485	490	495
Val Asp Glu Phe Pro Tyr Met Glu Leu Pro Glu His Tyr Leu Asp His			
	500	505	510
Phe Lys Leu Tyr Asp Pro Val Gly Gly Glu His Ala Asn Ile Phe Gly			
	515	520	525

Ala Gly Leu Lys Met Ala Asp Arg Val Val Thr Val Ser Pro Gly Tyr
530 535 540

Leu Trp Glu Leu Lys Thr Thr Glu Gly Gly Trp Gly Leu His Asp Ile
545 550 555 560

Ile Arg Glu Asn Asp Trp Lys Met Asn Gly Ile Val Asn Gly Ile Asp
565 570 575

Tyr Arg Glu Trp Asn Pro Glu Val Asp Val His Leu Gln Ser Asp Gly
580 585 590

Tyr Ala Asn Tyr Thr Val Ala Ser Leu Asp Ser Gly Lys Pro Arg Cys
595 600 605

Lys Ala Ala Leu Gln Arg Glu Leu Gly Leu Glu Val Arg Asp Asp Val
610 615 620

Pro Leu Ile Gly Phe Ile Gly Arg Leu Asp Gly Gln Lys Gly Val Asp
625 630 635 640

Ile Ile Gly Asp Ala Met Pro Trp Ile Ala Gly Gln Asp Val Gln Leu
645 650 655

Val Leu Leu Gly Ser Gly Arg Arg Asp Leu Glu Val Met Leu Gln Arg
660 665 670

Phe Glu Ala Gln His Asn Ser Lys Val Arg Gly Trp Val Gly Phe Ser
675 680 685

Val Lys Met Ala His Arg Ile Thr Ala Gly Ala Asp Val Leu Val Met
690 695 700

Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Asn Gln Leu Tyr Ala Met Ala
705 710 715 720

Tyr Gly Thr Val Pro Val Val His Ala Val Gly Gly Leu Arg Asp Thr
725 730 735

Val Ser Ala Phe Asp Pro Phe Glu Asp Thr Gly Leu Gly Trp Thr Phe
740 745 750

Asp Arg Ala Glu Pro His Lys Leu Ile Glu Ala Leu Gly His Cys Leu
755 760 765

Glu Thr Tyr Arg Lys Tyr Lys Glu Ser Trp Arg Gly Leu Gln Val Arg
770 775 780

Gly Met Ser Gln Asp Leu Ser Trp Asp His Ala Ala Glu Leu Tyr Glu
785 790 795 800

Glu Val Leu Val Lys Ala Lys Tyr Gln Trp
805 810

<210> 7

<211> 3288

<212> DNA

<213> Rice

<400> 7

tctagacata cgtatgigt tagattcatt aacatctata tglatgtggg taatgctaga	60
aagtcctaca ttgtgaaacg gagggagtag tgaagaagca agtgaagcag gggcaggtag	120
ggcgagaNat agccagggct gcaatcgtac tccctgagctt aaatacgcct tgaaatttgc	180
acttcaaaac taaaaaaaaa ggataaaagc aaacttattg agcactaggc ttggaatatt	240
ctagaictgc ccttgggtc atgaattatt aatggagact gtagitttgc aaggccttgt	300
gttattgggc ctgttcggct gcactcatac ggctgtgggt cagccggcca gaacagtact	360
ttatglaagt agttgtagca gtaacactgt ggtacagctg ctgcaccttg cagccgaaca	420
tgccccatta gcggcacata gaaccttata ttgtgtggc gttgtagtta ggccaacgac	480
tatcatgggt taaggagtg ttggctaatg ggaataggaa tgatttcca cccactaaaa	540
gcacttttaa ttctaacaat tcattatccc tcttccattt aatcctaact ctctatttat	600
ttcccaatcc taattccaig ccacattttt cattatccaa acacacccta aaaggctttt	660
tagtggcgat ggaattgat catattccaa caataatgga tatggatac actgaagtig	720
tctaagcccc ttaagtgtc cattgagact ttgagagatg cctgggaatt gaagcaagga	780
ttgctgaagc aaaagaggct taagagcttg cacagaigag attgtgtgtt cccgtaggaa	840
tccggcctag actattgtat cagagatata atcgctattt ttataattat aattaataaa	900
gctctttctt ttaccctaa aaagtaaaag atccgtacat acgatccaig gtgatgggtg	960
ggtgttggcg gaataaaagc ttacggtagc atgtaggcgc tcataatccaa tcataaaatt	1020
tcgagttgat atttttttaa gaaccaagta taaaagtatc aatgaagta tatacggatc	1080
tcgagatgga ctaaatagat tttagaaact tgtgtgtcat gtatatggct tggaaatttc	1140
attgtatatt tagcctatta gcgtttaaca aataatctaaa agtgctaaat aaatacttcc	1200
tccgtttaag gtgataagac gttttgacta agtttataga taaatatagt aattaatatt	1260
tataatatca aattagtitt attaaatcaa tagttgaata tattttcaca aaaaatttgt	1320
cttgagttga aaatattatt tttttctata aacttagtta taattaaaac aatttgactt	1380
tgactaaagt caaaatgitt tttaacttga aaaggatgia gtaactttcg taaccctttg	1440
ctagaaaaat ttgttacaca ggagctgtac actgtgccgt tacttttgca tgggcatggg	1500
ccgttacttg tgctgtgcc gcittacagc caagcccaat agcaaggctc aaagatgggc	1560

tagtttttct cggcccaagc cgtctgttga acagcgtgga gaaggccaca cggcccacgt 1620
gcatacgag gccgcgcact ggatttcaag atgggcctgcg cgagggtggac ggcccagatt 1680
gctacggcct tctacggcgt cacgtttttt tctgggtgcg gctgggtgcc gtgccttcgcg 1740
tacacgacag tgtacacgct gcactgcact ccaaagaaat ccgccgaaag tgcagttata 1800
cgtacgcaca atctgcaata cgtaccaaca gccgaaagca tataatggaca agcagccacg 1860
caagccatca gcacaacca cacgaagagc aggttttttt ttctgaatca agccatacgg 1920
tagtgcgacg ttcttattga tatagcagga aaaaaatac aaatctatag catlgagaga 1980
ctagttagga gaagaaaaag acggccacac cacatgccta catctgatcc tgctactgaa 2040
aacaaaacaa gcacacgaca cctagaagga atgggtcaca ctaagagaag ttttaacaaa 2100
ggagagaggt ggttgttgga atcaacatgt aattccaata gaaaaagaa ctigtattgt 2160
tgtagtaatc cgtaagtaaa cagaatcata tagataatgg tacaagcctg acccagttgt 2220
tgatatTTTT tttaatctcc ctgtcttgca cgtgcggtat agatgctaata gtgatgtggc 2280
agcaccgacg tcacacctgt gacatctggc catatgtcta cagctaatagc tgtgttttgt 2340
tcaattttta ttaaaggcaa ataaatact atatctacgg ttgtgcctat accaatigaa 2400
gttatgtcat atgaggcgtt ttctgtctat ctactgatga aatttacctc tctacatca 2460
gaaccgtgca atatcattac ttaatgtcagt gtaacgggat aaattggtag agtttttgag 2520
agtggaagct tctgtttttt tcaaaatttg gtaagatagc aataacaata atgagtttgg 2580
tttgttgtcc tattaaaatt tggtaatgcc aaaatttagt agggttaaaa ataacaacaa 2640
agtaaatatt ccttagttta aattgtttta gtigaagggt aaacattacc aaaaatttgt 2700
aggttaaaaa tgttaataaa aaaagcaaag ccttagttt aaattgtttc agttgaatgt 2760
tcaacattgc tcacaaaatg ttctctttaa tagtacttta ttattacaaa gagcatctga 2820
atctgtatta aaaaagtaca aaaaaaaca ttctgaatct agaaagggaa aatatctaga 2880
tctagaagcg actgcacgcg gccccacga aaagcccatg cacgtgggcc ccatcccgaa 2940
aaaagagcaa cagcctcacc gcctacctgc atgtgcaagt ggacgggtgcg cggttgcgcg 3000
ccgaaacgcg acgccccccc ccccccaac ccaaaaaccc acgggccccca cacgtcagct 3060
atacagtggg acccaccctt ccggccccac atgtcagcaa gacagtgata cctNctcccc 3120
cgcttctcg cgcggggcgc aacgcacacg ctccccctt atttaagtcg cgcggactcc 3180
ttagtcccca cactccccac gaactcgaat cccaactat aaataatcca ccggaatt 3240
cacaattcga tgcctctct cgaicggaga ttctgcaatt tctccgcc 3288

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09221

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N5/10, 9/10, 9/26, 15/09, 15/54, 15/63, A01H5/00,
C12Q/68, C12P19/04, 19/16, C08B30/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N5/10, 9/10, 9/26, 15/09, 15/54, 15/63, A01H5/00,
C12Q/68, C12P19/04, 19/16, C08B30/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA(STN), REGISTRY(STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Choo Harn et al., Isolation and characterization of the <i>zSSIIa</i> and <i>zSSIIb</i> starch synthase cDNA clones from maize endsperm., Plant Mol. Biol. 1998, Vol.37, No.4, pages 639 to 649	1-26/27-61
X/A	Ming Gao et al., Isolation, characterization, and expression analysis of starch synthase 11a cDNA from wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.). National Research Council Canada October 2000, Vol.43, No.5, pages 768 to 775	1-26/27-61
X/A	WO 99/14314 A1 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION), 25 March, 1999 (25.03.99), & EP 1012250 A1 & JP 2001-516575 A	27-61/1-26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
10 December, 2002 (10.12.02)

Date of mailing of the international search report
24 December, 2002 (24.12.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09221

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 01/62934 A1 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION), 30 August, 2001 (30.08.01), & AU 2001035237 A	27-49/ 1-26, 50-61
P, X/ P, A	T. Umemoto et al., Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between <i>japonica</i> -type rice varieties, Theor Appl Genet 2002, Vol.104, No.1, pages 1 to 8	1-26/27-61
P, X/ P, A	Aiko Nishi et al., Biochemical and Genetic Analysis of the Effects of Amylose-Extender Mutation in Rice Endosperm. Plant Physiology October 2001, Vol.127, pages 459 to 472	27-49/ 1-26, 50-61
A	Jennifer M. Imparl-Radosevich et al., Analysis of Purified Maize Starch Synthases IIa and IIb: SS Isoforms Can Be Distinguished Based on Their Kinetic Properties., Archives of Biochemistry and Biophysics February 1999, Vol.362, No.1, pages 131 to 138	1-61
A	Sadequr ROHMAN et al., Comparison of Starch-Branching Enzyme Genes Reveals Evolutionary Relationships Among Isoforms. Characterization of a Gene For Starch-Branching Enzyme IIa from the Wheat D Genome Donor <i>Aegilops tauschii</i> ¹ . Plant Physiology March 2001, Vol.125, pages 1314 to 1324	1-61

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N5/10, 9/10, 9/26, 15/09, 15/54, 15/63, A01H5/00, C12Q1/68, C12P19/04, 19/16, C08B30/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N5/10, 9/10, 9/26, 15/09, 15/54, 15/63, A01H5/00, C12Q1/68, C12P19/04, 19/16, C08B30/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	Choo Harn et al., Isolation and characterization of the <i>zSSIa</i> and <i>zSSIb</i> starch synthase cDNA clones from maize endsperm, Plant Mol. Biol. 1998, Vol. 37, No. 4, p. 639-649	1-26/27-61
X/A	Ming Gao et al., Isolation, characterization, and expression analysis of starch synthase <i>lla</i> cDNA from wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.). National Research Council Canada October 2000, Vol. 43, No. 5, p. 768-775	1-26/27-61

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.12.02

国際調査報告の発送日

24.12.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子

4N

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	WO 99/14314 A1 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION) 1999. 03. 25 & EP 1012250 A1 & JP 2001-516575 A	27-61/1-26
X/A	WO 01/62934 A1 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION) 2001. 08. 30 & AU 2001035237 A	27-49/ 1-26, 50-61
PX/PA	T.Umemoto et al., Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between <i>japonica</i> -type rice varieties., Theor Appl Genet 2002, Vol. 104, No. 1, p. 1-8	1-26/27-61
PX/PA	Aiko Nishi et al., Biochemical and Genetic Analysis of the Effects of <i>Amylose-Extender</i> Mutation in Rice Endosperm. Plant Physiology October 2001, Vol. 127, p. 459-472	27-49/ 1-26, 50-61
A	Jennifer M. Imparl-Radosevich et al., Analysis of Purified Maize Starch Synthases IIa and IIb: SS Isoforms Can Be Distinguished Based on Their Kinetic Properties., Archives of Biochemistry and Biophysics February 1999, Vol. 362, No. 1, p. 131-138	1-61
A	Sadequr ROHMAN et al. Comparison of Starch-Branching Enzyme Genes Reveals Evolutionary Relationships Among Isoforms. Characterization of a Gene for Starch-Branching Enzyme IIa from the Wheat D Genome Donor <i>Aegilops tauschii</i> ¹ . Plant Physiology March 2001, Vol. 125, p. 1314-1324	1-61

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.